

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **31/07/2000** (51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/12**, C12N 15/11,
(22) Fecha de presentación: **21/06/1999** C12N 15/85, C07K 14/47,
(21) Número de solicitud: **9905856** C12P 21/08, G01N 33/566

(86) Número de solicitud PCT: **US 97/23405**

(30) Prioridad(es): **20/12/1996 US 771737**

(71) Solicitante:
ABBOTT LABORATORIES
Chad 0377/AP6D-2 Abbott Park IL US

(72) Inventor(es):
CLARK A. BRIGGS
2280 Shannondale Libertyville IL 60048 US
MURALI GOPALAKRISHNANDAVID G.
MCKENNALISA M. MONTEGGIAJEAN-MARC
ROCHJAMES P. SULLIVANEDWARD TOUMA

(74) Representante:
JAVIER SAUCEDO C.
Moras No. 822 Benito Juarez D.F. 03230 MX

(54) Título: **UNA SUBUNIDAD DE RECEPTOR DE ACETILCOLINA ALFA-7-HUMANA VARIANTE Y METODOS DE PRODUCCION Y USO DE LA MISMA.**
(54) Title: **A VARIANT HUMAN ALPHA-7 ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBUNIT, AND METHODS OF PRODUCTION AND USE THEREOF.**

(57) Resumen

Se proporciona un polipptido de receptor de acetilcolina nicotínico alfa7 (nAChR) humano variante, en donde la variante contiene una substitución de aminoácido en la posición 274 de valina del nAChR alfa7 humano de tipo natural. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican el nAChR α7 variante, vectores y células huésped conteniendo tales moléculas de ácido nucleico. Además, se proporcionan métodos para producir la variante como son métodos para usar tales vacantes para clasificar compuestos por actividad en el nAChR.

(57) Abstract

A variant human 'alpha'7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) polypeptide is provided wherein the variant contains an amino acid substitution at the valine-274 position of the wild-type human 'alpha'7 nAChR. Nucleic acid molecules encoding the variant human 'alpha'7 nAChR, vectors and host cells containing such nucleic acid molecules are also provided. In addition, methods are provided for producing the variant as are methods of using such variants for screening compounds for activity at the nAChR.



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(S1) International Patent Classification:		(11) International Publication Number:	WO 98/28331
C12N 15/12, 15/11, 15/85, C07K 14/47, C12P 21/08, G01N 33/566	A3	(43) International Publication Date:	2 July 1998 (02.07.98)

(21) International Application Number:	PCT/US97/23405		
(22) International Filing Date:	22 December 1997 (22.12.97)		
(30) Priority Data:	08/771,737 20 December 1996 (20.12.96) US		
(71) Applicant:	ABBOTT LABORATORIES [US/US]; CHAD 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500 (US).		
(72) Inventors:	BRIGGS, Clark, A.; 2280 Shannondale, Libertyville, IL 60048 (US). GOPALAKRISHNAN, Murali; 1568 Oxford Circle, Grayslake, IL 60030 (US). MCKENNA, David, G.; 3404 Cove court, McHenry, IL 60050 (US). MONTEGGIA, Lisa, M.; Apartment 2A, 239 Dittmer, Lindenhurst, IL 60046 (US). RÖCH, Jean-Marc; Apartment 109, 1020 Lakehurst Drive, Waukegan, IL 60085 (US). SULLIVAN, James, P.; 705 Dimmeydale Drive, Deerfield, IL 60015 (US). TOUMA, Edward; 3313 Beacon Street #204, North Chicago, IL 60064 (US).		
(74) Agents:	DANCKERS, Andreas, M. et al.; Abbott Laboratories, CHAD 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500 (US).		

(54) Title: A VARIANT HUMAN ALPHA-7 ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBUNIT, AND METHODS OF PRODUCTION AND USE THEREOF

(57) Abstract

A variant human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) polypeptide is provided wherein the variant contains an amino acid substitution at the valine-274 position of the wild-type human $\alpha 7$ nAChR. Nucleic acid molecules encoding the variant human $\alpha 7$ nAChR, vectors and host cells containing such nucleic acid molecules are also provided. In addition, methods are provided for producing the variant as are methods of using such variants for screening compounds for activity at the nAChR.

UNA SUBUNIDAD DE RECEPTOR DE ACETILCOLINA ALFA-7 HUMANA
VARIANTE Y METODOS DE PRODUCCION Y USO DE LA MISMA

Campo técnico

5 La invención se refiere generalmente a proteínas de receptor y a moléculas de DNA y RNA que codifican para las mismas. En particular, la invención se refiere a una subunidad $\alpha 7$ humana vairante, en la cual existe una substitución de la posición 274 de valina de la subunidad $\alpha 7$ humana de tipo natural. La invención también se refiere a moléculas de DNA y
10 RNA que codifican la subunidad $\alpha 7$ humana variante, así como a métodos para usar la subunidad variante para identificar compuestos que interactúan con ella.

Antecedentes de la invención

15 Estos antecedentes consideran a la subunidad $\alpha 7$ como que se relaciona al receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR). El nAChR está comprendido de subunidades de polipéptido de transmembrana que forman un canal de iones selectivos-catión regulado por acetilcolina (ACh) y otros ligandos. Se cree que la región de transmembrana hidrofóbica M2 ("TM-2")
20 de cada subunidad forma la pared del canal de iones.

Dos de los nAChRs más prominentes en el cerebro son aquéllos que contienen subunidades $\alpha 4$ y aquéllos que contienen subunidades $\alpha 7$ (Sargent (1993) *Annu. Rev. Neurosci.* 16:403-443; Court *et al.* (1995) *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 9:6-14). Las mutaciones de
25 las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ pueden ser la razón de algunas enfermedades del

sistema nervioso. Por ejemplo, las mutaciones de la unidad $\alpha 4$ han sido asociadas con algunas formas de epilepsia (Beck *et al.* (1994) *Neurobiol. Disease* 1:95-99; Steinlein *et al.* (1995) *Nature Genetics* 11:201-203). Adicionalmente, nAChR conteniendo $\alpha 7$ puede estar involucrado en el 5 procesamiento sensorial relacionado con la esquizofrenia (Freedman *et al.* (1995) *Biol. Psych.* 38:22-33; Rollins *et al.* (1995) *Schizophr. Res.* 15:183; Stevens *et al.* (1995) *Psychopharmacol.* 119:163-170), citoprotección (Donnelly-roberts *et al.* (1996) *Brain Res.* 719:36-44; Akaike *et al.* (1994) *Brain Res.* 644:181-187; Martin *et al.* (1994) *Drug Dev. Res.* 31:135-141; 10 Quik *et al.* (1994) *Brain Res.* 655:161-167), y crecimiento de neurita e inervación (Chan *et al.* (1993) *Neurosci.* 56:441-451; Pugh *et al.* (1994) *J. Neurosci.* 14:889-896; Freeman (1977) *Nature* 269:218-222; Broide *et al.* (1995) *Neurosci.* 67:83-94).

Una variante de empalme que involucra la región TM-2 de la 15 subunidad $\alpha 7$ ha sido detectada en células de cromafina de bovino (García-Guzmán *et al.* (1995) *Eur. J. Neurosci.* 7:647-655), y una mutación que ocurre de manera natural de una proteína homóloga a la subunidad $\alpha 7$ encontrada en *Caenorhabditis elegans*, conduce a la neurodegeneración (Treinin *et al.* (1995) *neuron* 17:871-877). La última es una mutación de 20 aminoácido simple en la región TM-2 similar a la mutación de $\alpha 7$ valina-251 a treonina de pollo ("c- $\alpha 7$ V251T"), una de las varias mutaciones introducidas artificialmente en la subunidad $\alpha 7$ de pollo para facilitar el estudio de la estructura de nAChR $\alpha 7$ y la función de la subunidad (Bertrand *et al.* (1995) *Sem. Neurosci.* 7:75-90).

Comparado con el nAChR de tipo natural $\alpha 7$ de pollo ("c- $\alpha 7$ WT"), c- $\alpha 7$ V251T (también referida como $\alpha 7$ -4) retuvo una alta permeabilidad al calcio pero se desensibilizó lentamente, y fue 180 veces más sensible a ACh. Además, el nAChR de c- $\alpha 7$ V251T respondió a dihidro- β -eritroidina 5 ("DH β E"), normalmente un antagonista de nAChR en $\alpha 7$ y otro nAChR de tipo natural, como si fuera un agonista (Galzi *et al.* (1992) *Nature* 359:500-505; Bertrand *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6071-6975). Estos estudios han conducido a un modelo que delinea la estructura de la 10 región TM-2 de revestimiento de poro, y la hipótesis de que las mutaciones específicas dentro de la región TM-2 pueden generar canales de iones regulados por ligandos que conducen corriente en el estado receptor-desensibilizado además del estado receptor-activado normal (Bertrand *et al.* (1995) *supra*; Bertrand *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1261-1265; Galzi *et al.* (1995) *Neuropharmacol.* 34:563-582).

15 Aunque el nAChR $\alpha 7$ de pollo es farmacológicamente similar al nAChR $\alpha 7$ de mamífero, existen diferencias significativas. Por ejemplo, 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio ("DMPP") es un agonista parcial muy débil en el nAChR $\alpha 7$ de pollo, pero es un agonista altamente eficaz en el nAChR $\alpha 7$ humano (Peng *et al.* (1994) *Mol. Pharmacol.* 45:546-554). A pesar de 20 estas diferencias, se esperaría que los cambios de aminoácidos en el nAChR $\alpha 7$ humano que son análogos a aquéllos en el nAChR $\alpha 7$ de pollo, particularmente en aminoácidos de TM-2 críticos, resultaría en cambios farmacológicos y electrofisiológicos similares.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una subunidad $\alpha 7$ humana variante, en la cual se ha cambiado la valina-274 en analogía con la variante de receptor de pollo correspondiente. Esta variante es análoga a 5 la variante $\alpha 7V251T$ de pollo con respecto a la posición relativa de la substitución de aminoácido en la región TM-2. Sin embargo, la subunidad $\alpha 7$ humana variante exhibe inesperadamente, diferentes características farmacológicas y electrofisiológicas.

La subunidad $\alpha 7$ se combina consigo misma y puede combinarse con 10 otras subunidades para crear varios receptores de acetilcolina nicotínico. La posibilidad de combinación todavía con otras proteínas, las cuales pueden ser o no identificadas como componentes de otras clases de receptor, no está necesariamente excluida.

De acuerdo a esto, en una modalidad, se proporciona una molécula 15 de DNA, en donde la molécula de DNA codifica una subunidad $\alpha 7$ humana variante, en la cual se ha reemplazado la valina-274.

En otra modalidad, se proporciona un vector recombinante que comprende tal molécula de DNA.

En otra modalidad, la presente invención se dirige a una variante de 20 subunidad $\alpha 7$ humana, en la cual se ha reemplazado la valina-274.

Todavía en otras modalidades, la invención está dirigida a RNA mensajero codificado por el DNA, células huésped recombinantes transformadas o transfectadas con vectores que comprenden el DNA o fragmentos del mismo, y métodos para producir polipéptidos 25 recombinantes para el tratamiento de procesos neurodegenerativos,

función enzimática, desórdenes afectivos e inmunofunción, usando tales células.

En otra modalidad, se proporcionan compuestos tales como antagonistas, así como polinucleótidos antisentido, los cuales son útiles 5 para tratar condiciones, tales como procesos neurodegenerativos, disfunción enzimática, desórdenes afectivos e inmunofunción. También se proporcionan métodos para tratar individuos usando estos compuestos y polinucleótidos antisentido.

Todavía en otra modalidad, se proporcionan métodos y reactivos 10 para detectar la variante $\alpha 7$.

Todavía en otra modalidad, la invención se dirige a un método para expresar la variante de subunidad $\alpha 7$ humana en una célula, para producir la variante $\alpha 7$ resultante.

En una modalidad adicional, la invención se dirige a un método para 15 identificar compuestos que modulan la subunidad o receptores que contienen la subunidad y a un método para identificar compuestos citoprotectores usando tales células.

Estas y otras modalidades de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a aquéllos de habilidad ordinaria en la técnica en vista de la 20 descripción en la presente.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estrategia para generar el DNA mutante de AchR $\alpha 7V274T$ humano usando una reacción en cadena de polimerasa.

Las Figuras 2A-2C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) del cDNA $\alpha 7$ humano conteniendo la mutación V274T. La mutación de treonina se muestra en negritas y los sitios de restricción EcoRV y Kpn1 se muestran subrayados. También se muestra la secuencia de 5 aminoácidos deducida (SEQ ID NO:2) de la variante de subunidad $\alpha 7$ V274T humana derivada del cDNA. La alteración V274T está subrayada.

La Figura 3 compara gráficamente las relaciones concentración-respuesta para ACh (rombos), (-)-nicotina (círculos), GTS-21 (triángulos 10 señalando hacia arriba) y ABT-089 (triángulos señalando hacia abajo) en nAChR $\alpha 7$ V274T humano (símbolos rellenos) y nAChR $\alpha 7$ de tipo natural (símbolos huecos) expresados en oocitos de *Xenopus*.

La Figura 4 muestra gráficamente la activación por ACh y velocidad de deterioro de la respuesta $\alpha 7$ V274-T humana comparada con la del 15 nAChR $\alpha 7$ WT humano.

La Figura 5 muestra gráficamente las respuestas de $\alpha 7$ V274T humana a antagonistas de nAChR, en donde MEC es mecamilamina (10 M), MLA es metillicaconitina (10 nM), y DH β E es dihidro- β -eritroidina (10 M). El control agosista-0 fue una solución de baño sin medicamento y se 20 aplicó durante 20 segundos. Las pequeñas respuestas de control de agonista-0 se midieron en cada oocito de $\alpha 7$ V274T humano y se substrajeron de respuestas agonistas cuando se tabularon los datos.

La Figura 6 muestra gráficamente la corriente contra la relación de voltaje de respuestas a ACh 10 μ M de la $\alpha 7$ V274T humana expresada en 25 oocitos de *Xenopus laevis*, en donde los círculos representan las

respuestas medidas en una solución de Barth modificada conteniendo Ba^{2+} 10 mM (NaCl 90 mM, KCl 1 mM, NaNO_3 0.66 mM, BaCl_2 10 mM, NaHCO_3 2.4 mM, piruvato de sodio 2.5 mM, y amortiguador Na-HEPES 10 mM, pH final 7.55) para prevenir la activación de respuestas secundarias 5 dependientes de Ca^{2+} (ver Briggs *et al.* (1995) *Neuropharmacol.* 34:583-590) y los triángulos representan las respuestas medidas en solución "OR2" con atropina (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 1 mM. Atropina 0.5 M y amortiguador Na-HEPES 5 mM, pH final 7.4), para replicar las condiciones de Galzi *et al.* (1992) *Nature* 359:500-505.

10 La Figura 7 muestra gráficamente la ligadura específica de $[^{125}\text{I}]\alpha$ -Bungarotoxina, un ligando selectivo de nAChR $\alpha 7$, a un clon HEK-293 transfectado con $\alpha 7\text{V274T}$ humana variante.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

15 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de DNA recombinante, electrofisiología y farmacología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, 20 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989); *DNA Cloning*, Vols. I y II (D.N. Glover ed. 1985); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); la serie, 25 *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Transcription and Translation* (Hames *et al.* eds. 1984); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller *et al.* eds. (1987) Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (2a. ed., Springer-Verlag); y PCR: A Practical Approach (McPherson *et al.* eds. (1991) IRL Press).

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en 5 la presente, ya sea *supra* o *infra*, se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales, a menos que el contenido lo dicte claramente de otra manera. Así, por 10 ejemplo, la referencia a "un iniciador de amplificación" incluye dos o más de tales iniciadores, la referencia a "una subunidad de receptor" incluye más de una de tales subunidades, y similares.

A. Definiciones

15 Para describir la presente invención se emplearán los siguientes términos, y se pretende que estén definidos como se indica a continuación.

El término "AChR" pretende ser un receptor para la acetilcolina neurotransmisora ("ACh"). Los AchRs son subclasicados ampliamente como nicotínicos o muscarínicos. Estos tipos difieren en su farmacología, 20 estructuras y mecanismos de transducción de señal.

El término "nAChR" pretende ser un receptor de acetilcolina nicotínico. Aunque los nAChRs de varias estructuras de subunidades son mejor conocidos en células de músculo, neuronas, y células de cromafina, no son excluidos necesariamente de otros tipos de células (por ejemplo, 25 células gliales, células poste, células sanguíneas, fibroblastos, etc.).

El término "subunidad nAChR" pretende ser una molécula proteinácea, la cual puede combinar con otras de tales moléculas en la formación de un nAChR. Por ejemplo, se cree que el nAChR de músculo es un pentámero comprendido por cuatro tipos de subunidad de 5 transmembrana: dos subunidades α 1, una subunidad β 1, una subunidad δ y una subunidad γ o ϵ , dependiendo de la forma nAChR. También se piensa que el nAChR neuronal análogamente es pentamérico y comprendido por subunidades diferentes pero relacionadas. En la actualidad, se han aislado ocho subunidades α (α 2- α 9) neuronales y tres subunidades β (β 2-10 β 4) neuronales. Un nAChR neuronal parece requerir al menos una subunidad α y al menos una subunidad β para un complejo funcional (es decir, respuesta de canal de iones a ACh u otros agonistas). Sin embargo, algunas subunidades puede auto-ensamblarse para formar nAChR "homooligomérico", como en el caso de nAChR α 7 en oocitos de *Xenopus* y 15 en células de mamífero transfectadas. Aunque no se ha demostrado la combinación de subunidades nAChR con subunidades relacionadas con otros tipo de receptor (por ejemplo, otras clases de canal de iones regulado por ligando), está dentro del alcance de la presente invención que tales combinaciones son posibles.

20 El término "tipo natural" (abreviado "WT") pretende ser la forma típica, usual o más común como ocurre en la naturaleza. El nAChR α 7 tipo natural humano como se usa en la presente, se describió en Doucette-Stamm *et al.* (1993) *Drug Dev. Res.* 30:252-256. Una abreviatura de la forma " α 7XnnnO" pretende ser una subunidad α 7, en la cual el aminoácido 25 X, ubicado en posición nnn con relación a la secuencia tipo natural, ha

sido reemplazada por el aminoácido O. De esta manera, el nAChR $\alpha 7V251T$ de pollo indica el nAChR $\alpha 7$ de pollo, en el cual la valina ubicada en la posición 251 en el receptor de tipo natural ha sido reemplazada por una treonina.

5 Un "agonista colinérgico nicotínico" es un compuesto que se une a, y activa, un receptor de acetilcolina nicotínico. Por "activa" se pretende la extracción de una o más respuestas farmacológicas, fisiológicas o electrofisiológicas. Tal respuesta incluye, pero no está limitada a, despolarización de membrana celular y permeabilidad incrementada a Ca^{2+}

10 y otros cationes.

Un "antagonista colinérgico nicotínico" es una substancia que se une a un receptor de acetilcolina nicotínico y previene que agonistas activen al receptor. Los antagonistas puros no activan el receptor, pero algunas substancias pueden tener propiedades de agonista y antagonista

15 mezcladas. Los bloqueadores de canal colinérgico nicotínico bloquean la capacidad de los agonistas para extraer flujo corriente a través del canal de receptor de acetilcolina nicotínico, pero los hacen al bloquear el canal en lugar de prevenir que los agonistas se unan a, y activen, el receptor.

Un "modulador colinérgico nicotínico" es una substancia que

20 influencia la actividad del receptor de acetilcolina nicotínico a través de la interacción en uno o más sitios diferentes al sitio de unión de agonista clásico. El modulador puede incrementar o disminuir por sí mismo la actividad del receptor, o puede influenciar la actividad del agonista (por ejemplo, potenciar respuestas) sin extraer por sí mismo un canal abierto

25 en la corriente de canal. Una substancia simple puede tener diferentes

propiedades en diferentes subtipos de receptor de acetilcolina nicotínico, por ejemplo, ser un agonista en un receptor y un antagonista en otro, o un antagonista en uno y un bloqueador de canal en otro.

Por "regulador de nAChR" se pretende una substancia que puede 5 actuar como un agonista, antagonista, bloqueador de canal o modulador.

El término "polinucleótido" como se usa en la presente significa una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxiribonucléótidos. Este término se refiere solo a la estructura primaria de la molécula. De esta manera, el término incluye 10 DNA de simple y doble filamento, así como un RNA de simple y doble filamento. También incluye modificaciones, tales como metilación y/o mediante tapado, y formas no modificadas del polinucleótido.

El término "variante" se usa para referir a una secuencia de oligonucleótido, la cual difiere de la secuencia de tipo natural relacionada 15 en uno o más nucleótidos. Tal oligonucleótido variante se expresa como una variante de proteína, la cual, como se usa en la presente, indica una secuencia de polipéptido que difiere del polipéptido de tipo natural en la substitución, inserción o supresión de uno o más aminoácidos. El polipéptido variante difiere en estructura primaria (secuencia de 20 aminoácido), pero puede o no diferir significativamente en estructura secundaria o terciaria o en función con relación al tipo natural.

El término "mutante" generalmente se refiere a un organismo o una célula que exhibe un nuevo carácter genético o fenotipo como el resultado de cambio en su gene o cromosoma. Sin embargo, en algunos casos, 25 "mutante" puede usarse en referencia a una proteína variante u

oligonucleótido y "mutación" puede referirse al cambio implícito de la variante.

"Polipéptido" y "proteína" se usan en la presente de manera intercambiable e indican una cadena molecular de aminoácidos enlazados a través de ligaduras de péptido. Los términos no se refieren a una longitud específica del producto. De esta manera, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Los términos incluyen modificaciones post-traducción del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Además, se incluyen fragmentos de proteínas, análogos, proteínas con mutación o variantes, proteínas de fusión y similares dentro del significado de polipéptido.

Una "mutación funcionalmente conservadora" como se usa en la presente, pretende un cambio en un polinucleótido que codifica un polipéptido derivado, en el cual la actividad no se altera substancialmente comparado con aquélla del polipéptido a partir del cual se hace el derivado. Tales derivados pueden tener, por ejemplo, inserciones, supresiones o substituciones de aminoácidos en la molécula relevante que no afectan substancialmente sus propiedades. Por ejemplo, el derivado puede incluir substituciones de aminoácidos conservadoras, tales como, substituciones que conservan la carga general, hidrofobicidad/hidrofilicidad, porción de cadena lateral, y/o volumen estérlico del aminoácido substituido, por ejemplo, Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Asp/Glu, Lys/Arg, Asn/Gln, Thr/Ser y Phe/Trp/Tyr.

Por el término "mutante estructuralmente conservador" se pretende un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico, pero que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos como el polipéptido codificado por el polinucleótido, a partir 5 del cual se deriva la variante degenerada. Esto puede ocurrir porque un aminoácido específico puede codificarse por más de un "codón", o secuencia de tres nucleótidos, dentro del polinucleótido.

"Células huésped recombinantes", "células huésped", "células", "líneas de células", "cultivos de células", y otros de tales términos que 10 denotan microorganismos o líneas de células eucarióticas superiores cultivadas como entidades unicelulares, se refieren a células las cuales pueden ser, o haber sido, usadas como receptores para vectores recombinantes u otro DNA de transferencia, inmaterial del método mediante el cual el DNA es introducido en la célula o la subsecuente 15 disposición de la célula. Los términos incluyen la progenie de la célula original, la cual ha sido transfectada. Las células en cultivo primario, así como células tales como oocitos, también pueden ser usadas como receptores.

Un "vector" es un replicón, en el cual está unido otro segmento de 20 polinucleótido, tal como para originar la replicación y/o expresión del segmento unido. El término incluye vectores de expresión, vectores de clonación, y similares.

Una "secuencia de codificación" es una secuencia de polinucleótido que se transcribe en mRNA y/o se traduce en un polipéptido. Los límites 25 de la secuencia de codificación son determinadas por un codón de inicio

de traducción en el extremo 5' y un codón de paro de traducción en el extremo 3'. Una secuencia de codificación puede incluir, pero no está limitada a, mRNA, cDNA, y secuencias de polinucleótidos recombinantes. Pueden prepararse variantes o análogos mediante la supresión de una 5 porción de la secuencia de codificación, mediante inserción de una secuencia, y/o mediante substitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis de sitio dirigido, son bien conocidas por aquéllos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; DNA 10 *Cloning*, Vols. I y II, *supra*; *Nucleic Acid Hybridization*, *supra*.

“Operablemente enlazados” se refiere a una situación en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera pretendida. Así, por ejemplo, una secuencia de control “operablemente enlazada” a una secuencia de codificación está ligada en 15 tal manera, que se logra la expresión de la secuencia de codificación bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Una secuencia de codificación puede enlazarse operablemente a secuencias de control que dirigen la transcripción del polinucleótido, por lo cual dicho polinucleótido se expresa en una célula huésped.

20 El término “transfección” se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, irrespectiva del método usado para la inserción, o la forma molecular del polinucleótido que es insertado. Se incluyen la inserción de un polinucleótido *per se* y la inserción de un plásmido o vector comprendido por el polinucleótido 25 exógeno. El polinucleótido exógeno puede ser transcrita y traducido

directamente por la célula, mantenido como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o de manera alternativa, pueden integrarse de manera estable en el genoma huésped. La "transfección" se usa de manera general en referencia a una célula eucariótica, al tiempo que el 5 término "transformación" se usa para referirse a la inserción de un polinucleótido en una célula procariótica. "Transformación" de una célula eucariótica también puede referirse a la formación de un estado canceroso o tumorigénico.

El término "aislado" cuando se refiere a un polinucleótido o un 10 polipéptido, pretende que la molécula indicada esté presente en la ausencia substancial de otras macromoléculas biológicas similares. El término "aislado" como se usa en la presente significa que al menos 75% en peso, más preferiblemente 85% en peso, todavía más preferiblemente al menos 95% en peso y muy preferiblemente al menos 98% en peso de 15 una composición es el polipéptido o polinucleótido aislado. Un "polinucleótido aislado" que codifica un polipéptido particular se refiere a un polinucleótido que está substancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico, que no codifica el polipéptido objetivo; sin embargo, la molécula puede incluir mutaciones funcionales y/o estructuralmente 20 conservadoras, como se define en la presente.

Las siguientes abreviaturas de una sola letra de aminoácidos se usan a lo largo del texto:

	Alanina	A	Arginina	R
	Asparagina	N	Acido aspártico	D
25	Cisteína	C	Glutamina	Q

	Acido glutámico	E	Glicina	G
	Histidina	H	Isoleucina	I
	Leucina	L	Lisina	K
	Metionina	M	Fenilalanina	F
5	Prolina	P	Serina	S
	Treonina	T	Triptófano	W
	Tirosina	Y	Valina	V

B. Métodos generales

10 Se proporcionan en la presente una subunidad $\alpha 7$ humana variante, un polinucléotido que codifica la subunidad vairante, y métodos para hacer la subunidad variante. La invención no solo incluye la subunidad variante sino también métodos para clasificar compuestos que usan la subunidad variante, células que expresan la subunidad variante.

15 En una modalidad preferida, el polinucleótido codifica una variante de subunidad $\alpha 7$ humana, en la cual se ha reemplazado la valina-274 de la subunidad $\alpha 7$ de tipo natural. De preferencia, el polinucleótido codifica una subunidad $\alpha 7$ humana, en la cual se ha reemplazado la valina-274 por una treonina, o una substitución conservadora por la treonina, por ejemplo, 20 serina.

El nAChR variante $\alpha 7$ humano exhibe tanto propiedades similares e inesperadamente diferentes con relación a otros nAChRs estructuralmente relacionada. Por ejemplo, como con la variante $\alpha 7V251T$ de pollo, $\alpha 7V274T$, las respuestas a agonistas colinérgicos decaen lentamente 25 comparado con las respuestas de nAChR $\alpha 7$ de tipo natural humano.

Además, $\alpha 7V274T$ humana es aproximadamente dos órdenes de magnitud más sensible a agonistas de receptor colinérgico, tales como nicotina y ACh comparado con el tipo natural.

Las variantes de receptor de pollo y humana difieren 5 farmacológicamente, por ejemplo, en que $\alpha 7V274T$ humana se activa débilmente por dihidro- β -eritroideno (DH β E), al tiempo que $\alpha 7V251T$ de pollo se activa fuertemente (Figura 5 y Galzi *et al.* (1992). Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. (Las mutaciones en el dominio de canal de un receptor 10 nicotínico neuronal covierten la selectividad de iones de catiónica a aniónica). *Nature* 359:500-505). Además, la *d*-tubocurarina es un potente antagonista de $\alpha 7V274T$ humana a un activador de la $\alpha 7L247T$ de pollo relacionada mutante (Bertrand *et al.* (1992). Unconventional pharmacology 15 of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain. (Farmacología no convencional de un receptor nicotínico neuronal con mutación en el dominio del canal) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:1261-1265). Las variantes de receptor $\alpha 7$ humana y de pollo también son electrofisiológicamente diferentes. Por ejemplo, el nAChR $\alpha 7V251T$ de pollo no exhibe rectificación de corriente hacia adentro (Galzi *et al.* (1992), 20 a diferencia de nAChR $\alpha 7$ de tipo natural de pollo y humana, los cuales exhiben una fuerte rectificación hacia adentro (Galzi *et al.* (1992), *supra*, y Briggs *et al.* (1995) *Neuropharmacol.* 34:583-590). El nAChR $\alpha 7V274T$ humano, en contraste al nAChR $\alpha 7V251T$ de pollo, rectifica por encima de 0 mV de manera similar al receptor de tipo natural (Figura 6).

El DNA que codifica la subunidad de nAChR $\alpha 7$ variante humana puede derivarse de cDNA o genómico, preparado por síntesis, o por una combinación de técnicas. El DNA puede usarse entonces para expresar la subunidad de nAChR $\alpha 7$ variante humana o como una plantilla para la 5 preparación de RNA usando métodos bien conocidos en la técnica (ver, *Sambrook et al., supra*).

Un método para obtener el DNA deseado involucra cDNA aislante que codifica la subunidad de nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural, como se describe por Doucette-Stamm *et al.* (1993), *supra*. El cDNA de tipo natural 10 así obtenido entonces se modifica y amplifica usando la reacción en cadena de polimerasa ("PCR") y secuencias de iniciador con mutación para obtener el DNA que codifica la subunidad de nAChR $\alpha 7$ variante humana. De manera más particular, el PCR emplea iniciadores de oligonucleótidos 15 cortos (de manera general 10-20 nucleótidos en longitud) que igualan extremos opuestos de una secuencia deseada dentro de la molécula de DNA de tipo natural. La secuencia entre los iniciadores no necesitan 20 conocerse. La plantilla inicial puede ser RNA o DNA. Si se usa RNA, primero se transcribe a la inversa a cDNA. Entonces se desnaturaliza el cDNA, usando técnicas bien conocidas, tales como calor, e iniciadores de oligonucleótidos apropiados se adicionan en exceso molar.

Los iniciadores que portan la mutación hibridarán al polinucleótido tipo natural a una temperatura ligeramente por debajo de aquélla del duplo iniciador-polínucléotido de tipo natural. El iniciador puede hacerse específica al mantener la longitud y composición base del iniciador dentro 25 de límites relativamente estrechos, y al mantener la base o bases de

mutante ubicadas de manera central (Zoller *et al.* (1983) *Meth. Enzymol.* 100:468). La extensión del iniciador se efectúa usando polimerasa de DNA en la presencia de trifosfato de desoxinucleótido o análogos de nucleótidos. El producto resultante incluye los iniciadores respectivos en sus extremos 5', enlazados covalentemente a los complementos recién sintetizados de los filamentos originales. La molécula replicada nuevamente es desnaturalizada, hibridada con iniciadores, y así en adelante, hasta que el producto está suficientemente amplificado. Tales métodos de PCR se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 4,965,188; 4,800,159; 4,683,202; 4,683,195; 10 incorporado en la presente por referencia en su totalidad. El producto de la PCR se clona y los clones que contienen el DNA con mutación, se deriva por segregación del filamento extendido del iniciador y se selecciona. La selección puede lograrse usando el iniciador de mutante como una sonda 15 de hibridación.

De manera alternativa, el DNA de tipo natural puede obtenerse a partir de una genoteca de DNA apropiada. Las genotecas de DNA pueden ser sondeadas usando el procedimiento descrito por Grunstein *et al.* (1975) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 73:3961.

20 De manera alternativa, la variante α 7V274T podría generarse usando una aproximación de RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa) iniciando con RNA humano. Por ejemplo, se sintetiza cDNA de filamento simple a partir de RNA humano (aproximadamente 1.5 g) como la plantilla usando procedimientos 25 estándares de transcriptasa inversa. A continuación, se amplifica el cDNA

en dos segmentos y se introduce la mutación usando PCR y dos pares de iniciadores. Los iniciadores internos son diseñados para portar el codón para treonina (T) u otro cambio deseado, en lugar de la valina (V) de tipo natural en la posición 274 (ver también el Ejemplo 1 y la Figura 1). Los 5 productos de las dos reacción de PCR se combinan usando los iniciadores de extremo 3 y 5 para re-amplificar la secuencia de codificación de longitud completa de α 7V274T. Este solo es un ejemplo de la generación de α 7V274T de una plantilla de cerebro humano.

Los oligonucleótidos sintéticos pueden prepararse usando un 10 sintetizador de oligonucleótidos automatizado, tal como aquél descrito por Warner (1984) *DNA* 3:401. Si se desea, los filamentos sintéticos pueden marcarse con 32 P por tratamiento con cinasa de polinucleótido en la presencia de 32 P-ATP, usando condiciones estándares para la reacción. Las secuencias de DNA incluyendo aquéllas aisladas de genotecas de 15 cDNA o genómico, pueden modificarse por métodos conocidos, los cuales incluyen mutagénesis de sitio dirigido, como se describió por Zoller (1982) *Nucleic Acids Res.* 10:6487. Brevemente, el DNA a ser modificado se empaca en un fago como una secuencia de filamento simple, y se convierte a un DNA de doble filamento con DNA polimerasa usando, como 20 un iniciador, un oligonucleótido sintético complementario a la porción del DNA a ser modificado, y teniendo la modificación deseada incluida en su propia secuencia. El cultivo de las bacterias transformadas, las cuales contienen replicaciones de cada filmaneto del fago, se platinan en agar 25 para obtener placas. Teóricamente, 50% de las nuevas placas contienen fago teniendo la secuencia con mutación, y el 50% restante tiene la

secuencia original. Las réplicas de las placas se hibridan a una sonda sintética marcada a temperaturas y condiciones adecuadas para hibridación con el filamento correcto, pero no con la secuencia sin modificar. Se recuperan las secuencias que han sido identificadas por 5 hibridación y se clonian. De manera alternativa, puede ser necesario identificar clones por análisis de secuencia si existe dificultad para distinguir la pequeña diferencia de variante de tipo natural por hibridación. En cualquier caso, el DNA sería confirmado por secuencia.

Una vez producido, el DNA puede incorporarse entonces en un 10 vector de clonación o un vector de expresión para replicación en una célula huésped adecuada. La construcción del vector emplea métodos conocidos en la técnica. De manera general, el corte de DNA de sitio específico se realiza al tratar con enzimas de restricción adecuadas bajo condiciones, las cuales generalmente son especificadas por el fabricante 15 de estas enzimas comercialmente disponibles. Después de la incubación con la enzima de restricción, la proteína es removida por extracción y el DNA es recuperado por precipitación. Los fragmentos cortados pueden separarse usando, por ejemplo, métodos de electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, de acuerdo a métodos conocidos por aquéllos 20 expertos en la técnica.

Los fragmentos de corte de extremo pegajoso pueden terminarse sin punta usando DNA polimerasa 1 de *E. coli* (Klenow) en la presencia de los trifosfatos de desoxinucleótido apropiados (dNTPs) presentes en la mezcla. También puede usarse el tratamiento con nucleasas S1, resultando 25 en la hidrólisis de cualquier porción de DNA de filamento simple.

Las uniones se realizan usando condiciones de temperatura y amortiguador estándares usando DNA ligasa T4 y ATP. Alternativamente, la digestión de enzima de restricción de fragmentos no deseados puede usarse para prevenir la unión.

5 Las construcciones de vectores estándares incluyen, de manera general, elementos de resistencia antibiótica específicos. Las mezclas de ligación se transforman en un huésped adecuado, y los transformantes exitosos son seleccionados por resistencia antibiótica u otros marcadores. Los plásmidos para los transformantes pueden prepararse entonces de
10 acuerdo a métodos conocidos por aquéllos en la técnica, siguiendo usualmente una amplificación de cloramfenicol como se reporta por Clewell *et al.* (1972) *J. Bacteriol.* 110:667 puede adicionarse. El DNA es aislado y analizado generalmente mediante análisis de enzima de restricción y/o secuenciación. La secuenciación puede ser mediante el método bien
15 conocido de dideoxi de Sanger *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463) como se describe adicionalmente por Messing *et al.* (1981) *Nucleic Acid Res.* 9:309, o mediante el método reportado por Maxam *et al.* (1980) *Meth. Enzymol.* 65:499. Los problemas con la compresión de banda, los cuales se observan algunas veces en regiones ricas en GC, son
20 superados mediante el uso de, por ejemplo, T-desazoguanosina o inosina, de acuerdo al método reportado por Barr *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:428.

Las células huésped son diseñadas genéticamente con los vectores de esta invención, los cuales pueden ser un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar en la forma de un plásmido,
25 una partícula viral, un fago, etc. Las células huésped diseñadas pueden

cultivarse en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionado transformantes/transfectantes o amplificar el polinucleótido que codifica una subunidad. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, generalmente son similares a aquéllas usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y será evidentes para aquéllos de habilidad en la técnica.

Pueden usarse tanto células huésped procarióticas como eucarióticas para expresión de las secuencias de codificación deseadas, cuando se usan las secuencias de control apropiados que son compatibles con el huésped designado. Por ejemplo, entre los huéspedes procarióticos, frecuentemente se usa *Escherichia coli*. Además, por ejemplo, las secuencias de control de expresión para procariotes incluyen, pero no están limitadas a, promotores, conteniendo opcionalmente porciones de operador, y sitios de ligadura de ribosomas. Los vectores de transferencia compatibles con huéspedes procarióticos pueden derivarse de, por ejemplo, el plásmido pBR322 que contiene operones que confieren resistencia de ampicilina y tetraciclina. Y los diversos vectores de pUC, que también contienen secuencias que confieren marcadores de resistencia antibiótica. Estos marcadores pueden usarse para obtener transformantes exitosos por selección. Las secuencias de control procarióticas comúnmente usadas incluyen, pero no están limitadas a, un sistema de operón de lactosa (Chang *et al.* (1977) *Nature* 198:1056), el sistema de operón de triptófano (reportado por Goeddel *et al.* (1980) *Nucleic Acid Res.* 8:4057) y el promotor P1 derivado-lambda y el sitio de

ligadura de ribosoma de gene N (Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128) y el promotor *Tac* híbrido (De Boer *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292:128) derivado se secuencias de los promotores UV5 *trp* y *lac*. Los sistemas anteriores son particularmente compatibles con *E. coli*; sin embargo, otros huéspedes procarióticos, tales como, cepas de *Bacillus* o *Pseudomonas* pueden usarse si se desea.

Los huéspedes eucarióticos incluyen células de levadura y mamífero en sistemas de cultivo. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. carlsbergensis* se usan huéspedes de levadura comúnmente usados. Los vectores compatibles portan marcadores que permiten la selección de transformantes exitosos al conferir prototrofia a mutantes auxotróficos o resistencia a metales pesados en cepas de tipo natural. Los vectores compatibles de levadura pueden emplear el origen 2- μ de replicación (Broach *et al.* (1983) *Meth. Enzymol.* 101:307), la combinación de CEN3 y ARS1 u otros medios para asegurar la replicación, tales como, secuencias que resultarán en la incorporación de un fragmento apropiado en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de control para vectores de levadura son conocidas en la técnica e incluyen, pero no están limitadas a, promotores para la síntesis de enzimas glicolíticas, incluyendo el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa. Ver, por ejemplo, Hess *et al.* (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, Holland *et al.* (1978) *Biochemistry* 17:4900 y Hitzeman (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073. Por ejemplo, algunos sistemas de control útiles son aquéllos que comprenden el promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o promotor regulable de alcohol deshidrogenasa (ADH), terminadores también derivados de GAPDH, y, si se desea

secreción, secuencias líderes de factor alfa de levadura. Además, la región reguladora de transcripción y la región de iniciación de transcripción, las cuales están enlazadas operablemente pueden ser tales, que no se asocian de manera natural en el organismo de tipo natural.

5 Las líneas de células de mamífero disponibles como huésped para expresión son conocidas en la técnica y están disponibles de depósitos tales como, American Type Culture Collection. Estas incluyen, pero no están limitadas a, células HeLa, células de riñón embrionario humano (HEK), células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de 10 hámster bebé (BHK), y otras. Los promotores adecuados para células de mamífero también son conocidas en la técnica e incluyen promotores virales, tales como aquéllas de Simian Virus 40 (SV40), virus de sarcoma de Rous (RSV), adenovirus (ADV), virus de papiloma bovino (BPV), citomegalovirus (CMV). Las células de mamífero también pueden requerir 15 secuencias terminadoras y secuencias de adición poli A; también pueden incluirse secuencias intensificadoras, las cuales aumentan la expresión, y también pueden ser deseables las secuencias que provocan la amplificación del gene. Estas secuencias son conocidas en la técnica. Los vectores adecuados para la replicación en células de mamífero pueden 20 incluir replicones virales, o secuencias las cuales aseguran la integración de las secuencias apropiadas que codifican la subunidad de nAChR $\alpha 7$ variante en el genoma del huésped. Un ejemplo de un sistema de expresión de mamífero para nAChRs se describe en Gopalakrishnan *et al.* 25 (1995) Stable expression and pharmacological properties of the human $\alpha 7$ nicotinic acetilcholine receptor. (Expresión estable y propiedades

farmacológicas del receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ humano). *Eur. J. Pharmacol.-Mol. Pharmacol.* 290:237-246.

Otros sistemas eucarióticos también son conocidos, como son métodos para introducir polinucleótidos en tales sistemas, tales como 5 células anfibias usando métodos descritos en Briggs *et al.* (1995) *Neuropharmacol.* 34:583-590, células de insectos usando métodos descritos en Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987), y similares.

El sistema de expresión de baculovirus puede usarse para generar 10 altos niveles de proteínas recombinantes en células huésped de insectos. Este sistema permite un alto nivel de expresión de proteína, al tiempo que procesamiento post-traducción de la proteína en una manera similar a células de mamíferos. Esos sistemas de expresión usan promotores virales que son activados siguiendo la infección de baculovirus para 15 manejar la expresión de genes clonados en las células de insectos (O'Reilly *et al.* (1992), *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, IRL/Oxford University Press).

La transfección puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo empacar el 20 polinucleótido en un virus y transducir una célula huésped con el virus, mediante la toma directa del polinucleótido por la célula huésped, y similares, dichos métodos son conocidos para aquéllos expertos en la técnica. Los procedimientos de transfección seleccionados dependen del huésped a ser transfectado y son determinados por el que realiza la rutina.

La expresión de la subunidad de receptor variante puede detectarse mediante el uso de un radioligando selectivo para el receptor. Por ejemplo, para el receptor colinérgico nicotínico, tal ligando puede ser [¹²⁵I] α -bungarotoxina. Sin embargo, cualquier técnica de ligadura de radioligando conocida en la técnica puede usarse para detectar la subunidad de receptor (ver, por ejemplo, Winzor *et al.* (1995) *Quantitative Characterization of Ligand Binding*, Wiley-Liss, Inc., NY).

El polipéptido de nAChR variante es recuperado y purificado de los cultivos de células huésped recombinantes que expresan el mismo mediante métodos conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de hidroxiapatita o cromatografía de 15 lectina. Pueden usarse pasos re-dobladores de proteína, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína. Finalmente, la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) puede emplearse para pasos de purificación final.

El polipéptido α 7 variante humano, o fragmentos del mismo, de la 20 presente invención también puede ser sintetizado mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis química, tal como, síntesis de péptido de fase sólida. En general, estos métodos emplean ya sea métodos de síntesis de fase sólida o en solución. Ver, por ejemplo, J.M. Stewart y J.D. Young, *Solid Phase Peptide 25 Synthesis*, 2^a Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y

R.B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, synthesis, Biology*, editores E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, (1980), pp 3-254, para técnicas de síntesis de péptido de fase sólida; y M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin (1984) y e. Gross y 5 J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, supra*, Vol. 1, para síntesis en solución clásica.

En un sistema preferido, ya sea el DNA o el RNA derivado del mismo, codificando ambos la subunidad de nAChR $\alpha 7$ humana variante deseada, pueden expresarse mediante inyección directa en una célula, tal 10 como un oocito de *Xenopus laevis*. Usando este método, la funcionalidad de la variante de subunidad de nAChR $\alpha 7$ humana codificada por el DNA o el mRNA pueden evaluarse como sigue (ver Dascal (1987) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:317-387). Un polinucléotido codificando variante se inyecta en un oocito para traducción en una subunidad de receptor funcional. La 15 función del nAChR $\alpha 7$ humano variante expresado puede valorarse en el oocito mediante una variedad de técnicas electrofisiológicas incluyendo registro de voltaje intracelular, abrazadera de voltaje de dos electrodos, métodos de agarradera de parche, y similares. El canal conductor de cationes intrínseco para el nAChR abre en respuesta a ACh u otros 20 agonistas colinérgicos nicotínicos, permitiendo el flujo de corriente transmembrana. Esta corriente puede monitorearse directamente mediante técnicas de agarradera de voltaje o indirectamente mediante registro de voltaje intracelular, en donde se miden los cambios en el potencial de la membrana debido a la corriente inducida.

Los receptores expresados en una célula huésped recombinante pueden usarse para identificar compuestos que modulan la actividad de nAChR. A este respecto, se demuestra la especificidad de la ligadura de un compuesto que muestra afinidad por el receptor al medir la afinidad del 5 compuesto por células que expresan el receptor o membranas de estas células. Esto puede hacerse al medir la ligadura específica de compuesto marcado (por ejemplo, radioactivo) a las células, las membranas celulares o su receptor aislado, o al medir la capacidad del compuesto para desplazar la ligadura específica de un ligando marcado estándar. La 10 expresión de receptores variantes y clasificación por compuestos que se ligan a ellos, o inhibir la ligadura del ligando marcado a estas células o membranas, proporciona un método para la rápida selección de compuestos con alta afinidad para el receptor. Estos compuestos pueden ser agonistas o antagonistas para el receptor.

15 Los receptores expresados también pueden ser usados para clasificar compuestos que modulan la actividad del receptor de acetilcolina nicotínico, es decir, agonistas o antagonistas colinérgicos nicotínicos. Un método para identificar compuestos que modulan la actividad de nAChR, comprende proporcionar una célula que exprese un polipéptido de receptor 20 de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ humano variane (nAChR) teniendo una substitución de aminoácido en la posición valina-274 del polipéptido de nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural, combinando un compuesto de prueba con la célula y midiendo el efecto del compuesto de prueba sobre la actividad de receptor variante. La célula puede ser una célula bacteriana, 25 una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula anfibia o

cualquier otra célula que exprese el receptor. De preferencia, la célula es una célula de mamífero o una célula de anfibio. De esta manera, por ejemplo, un compuesto de prueba es evaluado por su capacidad para extraer una respuesta apropiada, por ejemplo, la estimulación de flujo de 5 corriente transmembrana, o por su capacidad para inhibir la respuesta a un agonista colinérgico.

Además, los receptores expresados pueden usarse para clasificar compuestos que exhiben un efecto citoprotector. La activación anormal de canales de membrana es una causa potencial de enfermedad 10 neurodegenerativa. A este respecto, un número de desórdenes humanos heredados son acompañados por degeneración neuronal (Adams *et al.* (1989) *Degenerative Disease of the Nervous System*, en *Principles of Neurology*, McGraw-Hill, NY, pp. 921-967). Se han usado muchos sistemas de modelo para estudiar las causas de estas enfermedades. Por 15 ejemplo, las mutaciones en proteínas que tienen similitud de secuencia extensiva a proteínas que contribuyen al canal de iones de sodio sensible a amilorida han sido asociadas con neurodegeneración vacuolada en el nemátodo *C. Elegans* (Canessa *et al.* (1993) *FEBS Lett.* 318:95-99; y Voilley *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:247-251). Una mutación 20 así llamada de "ganancia de función" en la proteína *deg-3* de *C. Elegans*, provoca la degeneración vacuolada de un pequeño conjunto de neuronas (Treinin *et al.* (1995), *supra*). Estudios de esta mutación sugirieron a estos investigadores que la mutación en receptores de acetilcolina neuronal pueden conducir a la muerte de poblaciones neuronales específicas.

Adicionalmente, la variante $\alpha 7$ pueden usarse para clasificar compuestos útiles para tratar desórdenes tales como alteraciones en regulación sensorial, dolor neuropático e inmunofunción, por ejemplo, dolor asociado con condiciones de cáncer, neuralgia post herpética, neuropatía 5 diabética y osteoartritis. Además, la variante $\alpha 7$ podría ser usada para tratar o matar células cancerosas.

De acuerdo a esto, los medicamentos nicotínicos son considerados agentes terapéuticos potenciales en varios desórdenes neurodegenerativos que incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Dawn, 10 kuru, enfermedad de Parkinson, atrofia de sistemas múltiples, dolor neuropático y similares, en los cuales pueden ser útiles para disminuir la muerte celular. La activación del nAChR $\alpha 7$ de tipo natural para extraer propiedades citoprotectoras (por ejemplo, lisis de células reducida, ver Donnelly-Roberts *et al.* (1996) *In vitro* neuroprotective properties of the 15 novel cholinergic channel activator (ChCA) (Propiedades neuroprotectoras *in vitro* del activador de canal colinérgico novedoso (ChCA)), ABT-418. *Brain Res.* 719:36-44). Sin embargo, todavía no se establece finalmente si un agonista completo o agonista parcial es preferible, ni si lo último, qué tipo de agonista parcial es mejor (por ejemplo, uno que estabiliza los 20 estados abierto y desensibilizado o una que estabiliza los estados abierto y de descanso del receptor). Este nAChR $\alpha 7$ variante puede usarse para evaluar estas cuestiones, y para seleccionar entre ligandos para tipos específicos de agonistas parciales o tipos específicos de antagonistas. Esto es porque este nAChR $\alpha 7$ variante conduce corriente en los estados 25 desensibilizado así como el abierto, a diferencia del receptor de tipo

natural que conduce solamente en el estado abierto (ver Bertrand y Changeux (1995) Nicotinic receptor: An allosteric protein specialized for intercellular communication. (Receptor nicotínico: una proteína alostérica especializada para comunicación intercelular) *Sem. Neurosci.* 7:75-90).

5 De esta manera, con el agonista de subunidad de nAChR variante humano se cambia la potencia dos órdenes de magnitud a un nivel consistente con la afinidad del agonista para el estado desensibilizado. Adicionalmente, se esperaría que los ligandos que son agonistas parciales en la subunidad de nAChR $\alpha 7$ de tipo natural debido a su capacidad para estabilizar los 10 estados desensibilizado así como el abierto, tengan eficacia incrementada en la subunidad de nAChR variante debido a su capacidad para conducir en el estado desensibilizado. Ejemplos de tales cambios de potencia y eficacia son mostrados por el nAChR $\alpha 7V274T$ variante en la Figura 3.

De esta manera, la farmacología del ligando de nAChR $\alpha 7$ puede 15 definirse en novedosas formas a través del uso de la subunidad de nAChR variante humana. Las substancias podrían ser antagonistas en el nAChR $\alpha 7$ de tipo natural debido a su capacidad para estabilizar el estado desensibilizado no conductor, o debido a otros mecanismos, tales como estabilizar el estado restante o bloquear el canal de iones. Mecanismos 20 similares podrían contribuir al agonismo parcial en el nAChR $\alpha 7$ de tipo natural. La capacidad de un ligando para estabilizar el estado desensibilizado podría evaluarse al comparar la eficacia y potencia del ligando en el nAChR $\alpha 7$ variante (por ejemplo, $\alpha 7V274T$ humana) con su 25 potencia y eficacia en el nAChR $\alpha 7$ de tipo natural. La interacción de compuestos con el nAChR puede identificarse usando varios métodos,

incluyendo, pero no limitando a, medición electrofisiológica de flujo de corriente transmembrana o potencial eléctrico, medición de la fluorescencia de colorantes sensibles a iones o potencial, o medición de flujo de iones radioactivos (por ejemplo, $^{22}\text{N}^+$ o $^{86}\text{Rb}^+$), y una variedad de 5 sistemas de expresión de nAChR $\alpha 7$, por ejemplo, células de mamífero transfectadas en cultivo o células de anfibio inyectadas. Esta novedosa definición de farmacología de nAChR $\alpha 7$ acoplada con medidas del efecto del ligando $\alpha 7$ en el funcionamiento celular o animal podría ser crítica para el desarrollo de novedosos terapéuticos. Por ejemplo, podría determinarse 10 si un ligando que estabiliza el estado desensibilizado de la subunidad de nAChR $\alpha 7$ (agonista o antagonista parcial) es preferible para citoprotección. De igual manera, el tipo de ligando más o menos útil en otras aplicaciones nicotínicas, tales como cognición, memoria, ansiedad, atención, regulación sensorial (psicosis y esquizofrenia), etc., podrían ser 15 evaluadas usando subunidades de nAChR $\alpha 7$ variante solas o en combinación con otras subunidades de receptor.

Además de clasificar compuestos de prueba, la subunidad $\alpha 7$ variante expresada puede usarse para investigar mecanismos de citotoxicidad y citoprotección. La evidencia de que la activación de nAChR $\alpha 7$ es citoprotectora viene del hallazgo de que los agonistas de nAChR 20 extraen citoprotección en células que expresan la subunidad de nAChR $\alpha 7$ y que esta citoprotección es inhibida por antagonistas $\alpha 7$ selectivos (por ejemplo, ver Donnelly-Roberts *et al.*, *supra*). El mecanismo no es conocido, pero puede involucrar la estimulación del influxo de Ca^{2+} . Si es 25 así, entonces el influxo de Ca^{2+} incrementado mediado por el nAChR $\alpha 7$

variante, debido a la permeabilidad de Ca^{2+} mantenida con activación de corriente prolongada, puede aumentar la citoprotección. Por otra parte, como se sabe que el Ca^{2+} intracelular excesivo es citotóxico, la expresión o estimulación excesiva del nAChR $\alpha 7$ variante podría provocar la muerte 5 celular, quizás como se observa en *C. elegans* portando la mutación endógena en el análogo *deg3* a la variante $\alpha 7$. Todavía de manera alternativa, la subunidad de nAChR $\alpha 7$ también puede funcionar a través de mecanismos dependientes de un cambio en el estado receptor (por ejemplo, de conformación en descanso a desensibilizada), la cual puede 10 influenciar su interacción con otras proteínas, pero no necesariamente dependiente de un cambio en el flujo de iones o potencial eléctrico. La subunidad de nAChR $\alpha 7$ variante sería crítica para determinar tales mecanismos, ya que permitiría a uno identificar ligandos que favorecen 15 diferentes estados de receptor, y ya que proporciona una herramienta para manipular la corriente de canal de nAChR independientemente de la conformación de nAChR y unión de ligando.

Los compuestos citoprotectores o citotóxicos que interactúan con el nAChR variante pueden identificarse usando varios métodos. Uno de tales métodos comprende proporcionar una célula que expresa una subunidad 20 de nAChR $\alpha 7$ humana variante que tiene una substitución de aminoácido en la posición de valina-274 del polipéptido de nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural, combinar un compuesto de prueba con la célula, y monitorear la célula para un indicador de citotoxicidad. Si es necesario controlar la 25 acción espontánea de la subunidad de nAChR variante, puede expresarse de manera estable en una línea de células de mamífero recombinante bajo

el control de un promotor inducible, por ejemplo, el sistema LacSwitch, el cual es inducible por isopropiltiogalactósido ("IPTG"). La expresión de la subunidad de nAChR $\alpha 7$ variante sería mantenida a un bajo nivel hasta la inducción mediante la adición de IPTG. De manera alternativa, con o sin 5 un promotor inducible, las células transfectadas podrían ser cultivadas en la presencia de un bloqueador de nAChR $\alpha 7$, tal como, metilillicaconitina ("MLA") o mecamilamina, que prevendría o reduciría la acción citotóxica. Ambos bloqueadores son reversibles, permitiendo a uno medir el efecto del compuesto de prueba en la función de nAChR $\alpha 7$ después de que se lava 10 el bloqueador.

Los compuestos citoprotectores pueden identificarse por su capacidad para reducir muerte celular al tiempo que los compuestos citotóxicos pueden ser identificados por su capacidad para promover la muerte celular. Que estos efectos son mediados por la subunidad de 15 nAChR $\alpha 7$, variante o tipo natural, pueden identificarse por la capacidad de un bloqueador de nAChR $\alpha 7$ para prevenir el efecto. La muerte celular, o citotoxicidad, puede monitorearse por una variedad de técnicas incluyendo, pero no limitando a, la medición de número celular o densidad en el cultivo, de velocidad de crecimiento celular (por ejemplo, la 20 incorporación de aminoácido o nucleótido marcado), o de integridad celular por ejemplo, por toma de uncolorante (por ejemplo, azul tripano se excluye por células saludables) o por la liberación de un constituyente citoplásмico, tal como, lactato deshidrogenasa (LDH). Los agentes citoprotectores también pueden clasificarse por su capacidad para 25 antagonizar un nAChR variante a un grado mayor que un nAChR de tipo

natural, o por su capacidad para aumentar la velocidad de disminución del nAChR variante comparado con el nAChR de tipo natural, usando métodos descritos en los ejemplos proporcionados más adelante.

Además, el DNA o RNA derivado del mismo, puede usarse para
5 diseñar sondas de oligonucleótidos para DNAs de nAChR que expresan subunidades variantes. Como se usa en la presente, el término "sonda" se refiere a una estructura comprendida por un polinucléotido, como se definió antes, que contiene una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos presente en un
10 polinucleótido objetivo. Las regiones de polinucleótidos de sondas, pueden componerse de DNA, y/o RNA, y/o análogos de nucleótidos sintéticos. Tales sondas podrían ser útiles en ensayos de hibridación *in vitro* para distinguir la variante $\alpha 7$ del mensaje de tipo natural, con la condición de que puede ser difícil diseñar un método capaz de hacer tal
15 distinción dado la pequeña diferencia en codificación entre la variante y la de tipo natural. De manera alternativa, podría usarse un ensayo basado en PCR para amplificar la muestra de Rna o DNA para análisis de secuencia.

Adicionalmente, la subunidad de nAChR variante puede usarse para
20 preparar anticuerpos policlonales o monoclonales usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. La subunidad de nAChR variante o fragmentos relevantes pueden obtenerse usando la tecnología recombinante señalada más adelante, es decir, una célula recombinante que expresa la subunidad o fragmentos puede ser cultivada para producir
25 cantidades de la subunidad o fragmento que puede ser recuperado y

aislado. Alternativamente, la subunidad de nAChR vairante o fragmento del mismo puede sintetizarse usando técnicas sintéticas de polipéptido convencional, como se proporciona más adelante. Los anticuerpos monoclonales que exhiben especificidad y selectividad para la subunidad 5 de nAChR variante puede marcarse con una porción medible y detectable, por ejemplo, una porción fluorescente, radiomarcas, enzimas, marcas quimioluminiscentes y similares, y se usan en ensayos inmunofluorescentes *in vitro* o *in situ*, o similares. Los anticuerpos pueden usarse para identificar la subunidad de nAChR variante para fines 10 inmunodiagnósticos.

A continuación se encuentran ejemplos de modalidades específicas para realizar la presente invención. Los ejemplos son ofrecidos para fines ilustrativos solamente, no pretenden limitar el alcance de la presente invención en ninguna manera. Al preparar los ejemplos, se han hecho 15 esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se debe permitir alguna desviación y error experimental.

Materiales

20 El cloruro de acetilcolina ("ACh"), colagenasa Tipo 1A, cloruro de *d*-tubocurarina ("dTc"), gentamicina e hidrocloruro de mecamilamina ("MEC"), se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, U.S.A.). El hidrobromuro de dihidro- β -eritroidina ("DHBE"), y citrato de metillicaconitina ("MLA") se obtuvieron de Research Biochemicals 25 International (Natick, Massachusetts, U.S.A.). Se obtuvo tricaina

(metanosulfonato de éster etílico de ácido 3-aminobenzoico; Finquel) de Argent Chemical Laboratories (Fisheries Chemical Division, Redmond, Washington, U.S.A.).

5 Preparación de cDNA α 7 de tipo natural humano

El cDNA de subunidad de nAChR α 7 humano reportado por Doucette-Stamm *et al.* (1993, *supra*), se modificó para incluir el péptido de señal humano completo (MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEF (SEQ ID NO:3)) reportado por Elliott *et al.* (1993) *Soc. Neurosci. Abstr.* 19:69. Se sintetizó 10 el siguiente oligonucléotido: 5'-
GGGGCAGCACTCGAGCCAT**GAGGTGTAGCCCCGGAGGAGTGTGGCTG**
GCACTGGCAGCATCTCTCCTGCACGTGTCCCTGCAAGGCGAGTTCCAGAG
GAAGCTTACAAGGAGGGG-3' (SEQ ID NO:4). Este oligonucléotido contiene un sitio de restricción Xho I (itálicas) y un codón de iniciación 15 ATG (negritas) seguido por los siguientes 28 codones de la secuencia de cDNA de subunidad de nAChR α 7 humana. Codifica el péptido de señal completa y se extiende al sitio Hind III (subrayado) presente en el cDNA de subunidad de nAChR α 7. Los sitios Xho I y Hind III se flanquearon con nucleótidos adicionales para hacerlos internos dentro de la molécula. 20 Adicionalmente, el complemento inverso de este oligonucleótido se sintetizó. Los oligonucleótidos se tamplaron juntos, se digirieron con Xho I y Hind III, y entonces se ligaron en un vector pBluescript contenido el DNA de subunidad α 7 humana previamente digerido con Xho I y Hind II. Esto creó un nuevo cDNA que codifica una subunidad de nAChR α 7 25 humana de longitud completa. La secuencia del nuevo cDNA se confirmó

por secuenciación de dideoxi. El cDNA se cortó de pBluescript con *Xho* I y *Not* I, las salientes 5' se llenaron con polimerasa de Klenow, se enlazaron con adaptadores *BsT* XI, se digirieron con *Bst* XI, y se ligaron en el sitio *Bst* XI del vector pRcCMV (Invitrogen). La orientación de la 5 inserción en el vector de expresión se determinó por análisis de restricción con enzimas cortando el cDNA de subunidad de nAChR $\alpha 7$ en posiciones asimétricas.

10 Expresión de nAChR $\alpha 7$ en oocitos de *Xenopus laevis* y medición de características funcionales

La preparación de oocitos de *Xenopus laevis*, inyección con DNA o RNA de receptor, y medición de respuestas de nAChR $\alpha 7$ usando agarradera de voltaje de dos electrodos siguiendo procedimientos descritos previamente para el nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural (Briggs *et al.* (1995) *supra*) excepto que la atropina no estuvo presente de rutina en la solución de baño. Los oocitos se mantuvieron a 17-18°C en solución de Barth normal (NaCl 90 mM, KCl 1 mM, NaNO₃ 0.66 mM, CaCl₂ 0.74 mM, MgCl₂ 0.82 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, piruvato de sodio 2.5 mM, y amortiguador de Na N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico) 15 ("HEPES") 10 mM, pH final pH 7.55) conteniendo 100 g/ml de gentamicina. Las respuestas se midieron a un potencial de sostenimiento de -60 mV en solución de Barth modificada conteniendo BaCl₂ 10 mM y careciendo de CaCl₂ y MgCl₂. Sin embargo, en algunos experimentos (Figura 6) el potencial celular se varió intencionalmente con el fin de determinar la 20 respuesta a la relación corriente-voltaje y OR2 más atropina (NaCl 82.5

mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na-HEPEs 5 mM (pH 7.4) y sulfato de atropina 0.5 M) se usó para replicar las condiciones usadas por Galzi *et al.* (1992), *supra*, para estudiar el nAChR α 7 de pollo. Se aplicó agonista brevemente usando una válvula solenoide controlada por 5 computadora y un aplicador de empujar/jalar colocada dentro de 200-400 m del oocito. Las respuestas se registraron por computadora en sincronía con la aplicación de agonista. Se incluyeron antagonistas con agonista en el aplicador de empujar/jalar y se aplicaron al baño por superfusión durante al menos 3 minutos antes de la aplicación del agonista. Se 10 cuantificaron las respuestas al medir la amplitud del pico.

Las respuestas de α 7V274T humana, a diferencia de las respuestas de α 7WT humana, tendieron a incrementarse significativamente durante los experimentos. En consecuencia, los ensayos experimentales se agruparon, antes y después, mediante aplicaciones de control de ACh 10 15 M en el mismo oocito. Todas las respuestas se normalizaron a las respuestas de ACh 10 M con el fin de explicar los cambios en sensibilidad dentro del experimento y por variabilidad en expresión de receptor entre oocitos.

20

Ejemplo 1

Preparación de cDNA α 7V274T humano

Para generar la variante α 7V274T en un vector de expresión, el gene de subunidad de nAChR α 7 de tipo natural se digirió con enzimas de restricción EcoR V y Kpn I, y el segmento digerido se reemplazó un

producto de PCR mutante mediante ligación usando los procedimientos descritos más adelante.

La estrategia, en diagrama en la Figura 1, usó dos pasos de PCR seguido por digestión con enzimas de restricción para producir un 5 fragmento con mutación del cDNA de subunidad de nAChR α 7 de tipo natural y subclonación del fragmento con mutación en el cDNA α 7 humano de tipo natural. En el primer paso (A), se generaron dos fragmentos de DNA portando la mutación deseada mediante PCR usando los iniciadores apropiados. El nucleótido con mutación se incorporó en el iniciador 10 inverso (X-3') para el fragmento más grande y en el iniciador delantero (Y-5') para el fragmento más corto. Los dos iniciadores externos (X-5' y Y-3') se eligieron de manera que el producto de PCR final contendría sitios de restricción EcoRV y Kpn I.

El fragmento 5' más largo se generó usando el iniciador externo 15 delantero 5'-GTTTGGGTCTGGTCTTACG-3' (SEQ ID NO:5) y el iniciador interno inverso 5'-GCAGCATGAAGGTGGTAAGAGAG-3' (SEQ ID NO:6) portando la mutación. El fragmento 3' más corto se generó usando el iniciador interno delantero 5'-CTCTCTTACCAACCTTCATGCTGC-3' (SEQ ID NO:7), también portando la mutación, y el iniciador externo inverso 5'- 20 GTACTGCAGCACGATCACCG-3' (SEQ ID NO:8). Las condiciones para PCR consistieron de 100 ng de DNA α 7 de entrada, amortiguador 2X Pfue, 100 ng de cada par de iniciadores y 0.625 U de enzima Pfue (Stratagene, La Jolla, CA). Las reacciones se realizaron en un Perkin-Elmer 9600 durante 20 ciclos a 95°C durante 24 segundos, 60°C durante 22 segundos 25 y entonces 72°C durante 78 segundos.

En el segundo paso de PCR (B), estos dos fragmentos se reensamblaron usando los iniciadores externos. La secuencia se reamplificó y se generó un fragmento de DNA más largo portando la mutación deseada.

5 En el siguiente paso (C), el producto del paso (B) se digirió con KpnI y EcoRV, se purificó en gel, y se ligó en el cDNA $\alpha 7$ humano de tipo natural previamente digerido con KpnI y EcoRV. La secuenciación de dideoxi del cDNA final mostró la presencia de la mutación deseada y que no se había introducido ninguna otra mutación durante el proceso de PCR.

10 Las Figuras 2A-2C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) del mutante de cDNA $\alpha 7V274T$ humano. La secuencia de aminoácidos de la variante $\alpha 7V274T$ humano (SEQ ID NO:2) también se muestra en las Figuras 2A-2C.

15

Ejemplo 2

Relaciones de concentración-respuesta para agonistas en nAChR de tipo natural y $\alpha 7V274T$ humano

Se midieron las respuestas a varias concentraciones de agonistas usando subunidades de nAChR $\alpha 7V274T$ humanas expresadas a partir del 20 DNA preparado en el Ejemplo 1, que se inyectó en oocitos de *Xenopus laevis* como se describió antes. Las respuestas se midieron en amplitud de pico y se normalizaron a la respuesta a ACh 10 M. Los puntos de datos (Figura 3) muestran el promedio \pm s.e.m. de las respuestas normalizadas (n=4 a 10 para ACh, n=3 a 4 para (-)-nicotina, n=3 a 5 para GTS-21 y n=2 25 a 5 para ABT-089). Las curvas mostradas en la Figura 3 muestra la

ecuación de Hill ajustada a los datos (programa de cómputo SigmaPlot, Jandel Scientific, San Rafael, California, U.S.A.) con la excepción de las pequeñas respuestas para GTS-21 y ABT-089 en el tipo natural de $\alpha 7$. En el nAChR $\alpha 7$ de tipo natural humano, ACh y (-)-nicotina tuvieron valores de 5 EC_{50} de $156 \pm 20 \mu M$ y $83 \pm 10 \mu M$, respectivamente, y con los coeficientes de Hill de 0.94 ± 0.09 y 1.2 ± 0.2 , respectivamente. GTS-21 y ABT-089 fueron agonistas parciales, cuyos valores de EC_{50} no pudieron ser estimados debido a que las respuestas fueron tan débiles. Existe un claro cambio en potencia y eficacia en el nAChR $\alpha 7V274T$ humano. En el 10 nAChR $\alpha 7V274T$ humano, ACh y (-)-nicotina fueron dos órdenes de magnitud más potentes, con valores de EC_{50} de $1.02 \pm 0.04 \mu M$ y $0.94 \pm 0.12 \mu M$, respectivamente, y coeficientes de Hill de 1.8 ± 0.2 y 1.3 ± 0.2 , respectivamente. De manera más remarcable, GTS-21 fue un agonista 15 completo en el nAChR $\alpha 7V274T$ humano con un valor de EC_{50} de $4.3 \pm 0.3 \mu M$ y un coeficiente de Hill de 1.5 ± 0.1 , en contraste total con su efecto de agonista parcial débil en el nAChR $\alpha 7$ de tipo natural humano. ABT-089 también fue más potente y eficaz en el nAChR $\alpha 7V274T$ humano, con unos 20 valores de EC_{50} de $28 \pm 3 \mu M$ y un coeficiente de Hill de 2.3 ± 0.4 , pero fue un agonista parcial con una eficacia de $40 \pm 1\%$. Estos resultados con las subunidades de nAChR humano se correlacionan con el aumento de 180 veces en ACh observado con $\alpha 7V251T$ de pollo comparado con nAChR $\alpha 7$ de tipo natural de pollo (Galzi *et al.* (1992), *supra*). Sin embargo, esta es la primera demostración de que la potencia de (-)-nicotina también es

cambiada, y la primera demostración de que la potencia y eficacia de agonistas parciales son cambiadas en esta variante.

Ejemplo 3

5 Velocidad deactivación y decaimiento de α 7V274T humano

comparado con nAChR α 7WT humano de tipo natural

Las respuestas de $\alpha 7V274T$ humano y $\alpha 7WT$ humano a concentraciones EC_{50} de ACh (1 μM y 200 μM , respectivamente) se igualaron para amplitudes similares, y se muestran sincronizadas al inicio 10 de la aplicación de ACh y se ajustan para corriente de sostenimiento de base de línea equivalente (ver Figura 4). ACh se aplicó a $\alpha 7V274T$ humano durante 10 segundos y a $\alpha 7WT$ humano durante 2.5 segundos. Las breves tics como púas cerca del inicio y final de las trazas de $\alpha 7WT$ humano son artefactos eléctricos marcando la abertura y cierra de la 15 válvula de aplicación de agonista.

Las respuestas de $\alpha 7V274T$ humano se activaron y decayeron lentamente comparado con las respuestas de $\alpha 7WT$ humano. De manera similar, el nAChR mutante de pollo análogo se activó y decayó más lentamente en respuesta a ACh (Galzi *et al.* (1992), *supra*).

20

Ejemplo 4

Evaluación de antagonistas de nAChR para actividad de agonista en nAChR α 7V274T humano

Se ha encontrado que antagonistas de nAChR, tales como, dihidro- β -eritroidina (DH β E), *d*-tubocurarina y hexametonio, activan respuestas a variantes de nAChR TM-2 α 7 de pollo, cuando estos compuestos son aplicados como agonistas (Bertrand *et al.* (1992), *supra*). Esto, junto con 5 datos de registro de canal simple, ha sugerido (a) que los nAChR variantes conducen en el estado de receptor-desensibilizado, y (b) que los antagonistas de nAChR de tipo natural actúan al estabilizar el estado desensibilizado (Bertrand *et al.* (1995), *supra*).

En el nAChR α 7V274T humano, DH β E (10 μ M) también activó 10 respuestas de corriente hacia adentro como agonista (ver Figura 5). Sin embargo, estas respuestas fueron pequeñas, variando desde 2.8% hasta 6.9% de la respuesta a ACh 10 μ M (Tabla 1) a diferencia del nAChR α 7V251T de pollo homólogo, donde DH β E 10 μ M extrajeron una respuesta 15 de 66% tan grande como la respuesta de ACh (Bertrand *et al.* (1993) 20 Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neural α 7 nicotinic receptor (Mutaciones en dos sitios distintos dentro del dominio de canal M2 alteran la permeabilidad de calcio de receptor nicotínico α 7 neuronal). *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6971-6975).

Adicionalmente, a α 7V274T humano esto no fue una propiedad 20 general de antagonistas de nAChR. Tanto MLA antagonista α 7-selectivo como la mecamilamina antagonista de nAChR no selectiva (10 μ M) extrajeron el efecto opuesto, pequeñas corrientes hacia fuera como agonistas inversos variando en amplitud desde 0.9% hasta 12.4% de la

respuesta de corriente hacia adentro máxima para ACh, como se muestra en la Figura 5 y Tabla 1. Las trazas mostradas en la Figura 5, todas de un oocito simple, comparan respuestas a mecamilamina (MEC 10 μ M), metillicaconitina (MLA, 10 nM), dihidro- β -eritroidina (DH β E, 10 μ M) y 5 solución de baño (control de agonistas-0) aplicada durante 20 segundos cada una. Las pequeñas respuestas de control de agonista-0 se midieron en cada oocito de α 7V274T humano y se substrajeron de respuestas de agonistas cuando se tabularon los datos. Las líneas de calibración en la Figura 5 representan 10 nA y 2 segundos para todas las trazas.

10

Tabla 1Efectos de antagonistas colinérgicos en el mutante α 7V274Thumano y nAChR α 7 de tipo natural

nAChR	Ligando (μ M)	% de activación [‡] ACh 10 μ M	% de inhibición [§]	
			ACh 1 μ M	ACh 10 μ M
α 7V274T	DH β E (10)	4 \pm 1 (4)*	69 \pm 5 (4) [†]	52 \pm 6 (4) [†]
	d-TC (1)	-2 \pm 1 (4)	99 \pm 1 (4) [†]	97 \pm 3 (3) [†]
	MLA (0.01)	-4 \pm 2 (7)*	103 \pm 1 (4) [†]	95 \pm 3 (7) [†]
	MEC (10)	-1.9 \pm 0.2 (4) [†]	101 \pm 1 (4) [†]	53 \pm 2 (4) [†]
	ATROP (2)	0.1 \pm 0.1 (4)	28 \pm 7 (5)*	13 \pm 5 (6) [†]
		% de ACh 10 mM	% de ACh 200 μ M	% de ACh 10 mM

α 7WT	DH β E (10)	-0.2 \pm 0.1 (5)	41 \pm 10 (4)*	23 \pm 2 (4) †
	d-TC (1)	-0.1 \pm 0.1 (5)	28 \pm 2 (4) †	25 \pm 3 (4) †
	MLA (0.01)	-0.2 \pm 0.4 (3)	100 \pm 0.5 (4)	99 \pm 0.4 (4) †
	MEC (10)	-0.3 \pm 0.2 (3)	82 \pm 1 (3') †	85 \pm 3 (3) †
	ATROP (2)	0.2 \pm 0.5 (3)	4 \pm 3 (3)	12 \pm 3 (3)*

Abreviaturas: DH β E (dihidro- β -eritroidina); d-TC (*d*-tubocurarina); MLA (metillicaconitina); MEC (mecamilamina); ATROP (atropina).

* p<0.05 comparado a 0 (prueba t de Student de dos colas)

† p<0.005 comparado a 0 (prueba t de Student de dos colas)

‡ comparado con activación por 10 μ M

§ % de inhibición de la respuesta a ACh

La *d*-tubocurarina (1 μ M) tampoco produjo corrientes hacia adentro como agonista, pero produjo pequeñas corrientes hacia fuera (3-5% de la respuesta de corriente hacia adentro máxima a ACh) en dos de cuatro oocitos α 7V274T humanos. Las respuestas de corriente hacia fuera pueden ser debido a la estabilización del estado de descanso (cerrado) o a bloqueo de canal de nAChR espontáneamente abierto. En el nAChR α 7WT humano bajo condiciones similares, ni DH β E (10 μ M), MLA (10 nM), mecamilamina (10 μ M) ni *d*-tubocurarina (1 μ M) produjeron ninguna respuesta de corriente hacia adentro o hacia fuera significativa (Tabla 1). La atropina de antagonista muscarínico (2 μ M) solo tuvo poco efecto en cualquiera nAChR.

Ejemplo 5Evaluación de antagonistas de nAChR para actividad de
agonista en el nAChR α 7V274T humano

Los compuestos anteriores también se evaluaron como antagonistas de la respuesta a ACh tanto a nAChRs α 7V274T humano y α 7WT humano. Para cada nAChR, se usaron dos concentraciones de ACh: una cerca del valor EC₅₀ (1 μ M para α 7V274T y 200 μ M para α 7WT) y una cerca del nivel de respuesta máxima (10 μ M para α 7V274T y 10 mM para α 7WT). Los datos se muestran en la Tabla 1. DH β E (10 μ M), *d*-tubocurarina (1 μ M), 10 MLA (10 nM), y mecamilamina (10 μ M) actuaron como antagonistas en ambos nAChRs. La MLA antagonista selectiva α 7 fue particularmente potente, como se esperaba, bloqueando α 7V274T humano así como α 7WT humano a una concentración de 10 nM. De manera interesante, la mecamilamina (10 μ M), DH β E (10 μ M) y *d*-tubocurarina (1 μ M) parecieron 15 cada una inhibir α 7V274T humano más que α 7WT humano. La atropina (2 μ M) inhibió la respuesta de α 7V274T humana a ACh 1 μ M por 28%, pero tuvo poco efecto en la respuesta de α 7WT humano a ACh 200 μ M. Algunos oocitos tienen receptores muscarínicos endógenos activados por concentraciones bajas-micromolares de ACh (Kusano *et al.* (1982) *J. 20 Physiol. (Londres)* 328:143-170; Davidson *et al.* (1991) *FEBS Lett.* 284:252-256; y Dascal *et al.* (1980) *Life Sci.* 27:1423-1428). Sin embargo, esto no parece explicar el efecto de la atropina en α 7V274T humano, porque la mecamilamina de antagonista de nAChR (10 μ M) bloqueó completamente la respuesta a ACh 1 μ M en tres de los cinco oocitos h-

α 7V274T inhibidos por atropina (los otros dos no se expusieron a la mecamilamina).

DH β E (10 μ M) inhibió las respuestas de ACh máximas menos fuertemente de lo que inhibió las respuestas de ACh de EC₅₀ tanto en 5 α 7WT humano como α 7V274T humano (ver Tabla 1). La mecamilamina (10 μ M) también inhibió la respuesta de ACh máxima menos fuertemente que la respuesta de ACh de EC₅₀ en el nAChR α 7V274T humano, pero no en el nAChR α 7WT humano, donde la mecamilamina inhibió ambas concentraciones de ACh de manera similar. Las menores inhibiciones a 10 las concentraciones mayores de ACh pueden reflejar las interacciones antagonista-agonista competitivas.

De esta manera, el nAChR α 7V274T variante humano es similar al nAChR α 7V251T de pollo análogo en su sensibilidad incrementada a la activación de agonista y velocidad aparente menor de activación y 15 desensibilización. Sin embargo, los receptores difieren en que DH β E (10 μ M) activó la corriente hacia adentro de α 7V274T humano solo débilmente, comparado con un 66% de efecto similar a agonista en α 7V251T de pollo, y en que *d*-tubocurarina no activó corrientes hacia adentro en el h- 20 α 7V274T comparado con la respuesta completa a nAChR α 7L247T de pollo (Galzi *et al.* (1992), *supra*; Bertrand *et al.* (1993), *supra*). De esta manera, puede existir una diferencia de especie en los efectos de estas modificaciones de secuencia en la función de nAChR α 7, cuya diferencia es inesperada en vista de la información conocida con respecto a α 7V274T de pollo.

Ejemplo 6Rectificación α 7V274T humano

La relación corriente contra voltaje de las respuestas de nAChR variante α 7V274T humano a ACh 10 μ M se midió en oocitos bajo una agarradera de voltaje de dos electrodos, como se describió por Briggs *et al.* (1995) *Neuropharmacol.* 34:583-590. Esto se hizo bajo dos condiciones: (a) cuatro oocitos en solución de Barth modificada conteniendo Ba^{2+} para prevenir la activación secundaria de corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (NaCl 90 mM, KCl 1 mM, NaNO_3 0.66 mM, BaCl_2 10 mM, piruvato de sodio 2.5 mM, y amortiguador de Na-HEPES 10 mM, pH 7.55) como se describió por Briggs *et al.* (1995), *supra*, y (b) tres oocitos en solución OR2 hecha para replicar que fue usada por Galzi *et al.* (1992) *Nature* 359:500-505, en su estudio de variantes α 7 de pollo (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 1 mM, atropina 0.5 μ M, y amortiguador de Na-HEPES 5 mM, pH 7.4). Bajo ambas condiciones, se observó una clara rectificación hacia adentro de la respuesta de ACh ya que hubo una pequeña respuesta de corriente en los potenciales celulares por encima de 0 mV comparada con la respuesta de corriente a potenciales celulares negativos. De manera similar, nAChR α 7 de tipo natural (Briggs *et al.* (1995), *supra*) y nAChR α 7 de tipo natural (Galzi *et al.* (1992), *supra*) muestra una rectificación hacia adentro, pero la variante α 7V251T de pollo no mostró tal rectificación (Galzi *et al.* (1992), *supra*).

Ejemplo 7Estudios de expresión en líneas de células de mamíferos

El nAChR $\alpha 7$ de tipo natural (WT) y $\alpha 7V274T$ humano se transfecan en la línea de células de riñón embrionario humano, HEK-293 usando el 5 vector de expresión eucariótico, pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA), el cual contiene las secuencias promotoras del citomegalovirus humano para expresión constitutiva de alto nivel y contiene el gene de resistencia de neomicina para la selección de líneas de células estables resistentes a la genetina. Los cDNAs se transfecaron usando lipofectamina (GIBCO) 10 como se describieron en (Gopalakrishnan *et al.* (1995) *Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharm.)* 290:237-246). Usando esta aproximación, se han generado líneas de células estables que expresan el nAChR $\alpha 7$ WT humano, exhibiendo ligadura de [125 I] α -bungarotoxina clara, corriente evocada por acetilcolina y respuestas de influjo de Ca^{2+} (Gopalakrishnan *et al.* (1995), 15 *supra*; Delbono *et al.* (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (en imprenta)). Adicionalmente, los datos iniciales mostrados en la Figura 7 demuestran la viabilidad de la transfección de la variante $\alpha 7$ en células de mamífero.

La variante $\alpha 7V274T$ humana soporta la homología a la mutación espontánea de *deg-3* de *C. elegans* (u662), la cual parece ser citotóxica a 20 través de un mecanismo que es inhibido por antagonistas nicotínicos (Treinin y Chalfie (1995) A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans*. (Una subunidad de receptor de acetilcolina con mutación provoca degeneración neuronal en *C. elegans*) *Neuron* 14: 871-877). La respuesta de nAChR variante $\alpha 7V274T$ humana 25 dura más tiempo que las respuestas de tipo natural (Figura 4), pero, como

el nAChR variante $\alpha 7V251T$ de pollo, probablemente tiene alta permeabilidad de Ca^{2+} , de manera que la activación del receptor puede, bajo algunas condiciones, conducir a influjo de Ca^{2+} excesivo, y por ello la muerte celular. Además, existe alguna evidencia de que el nAChR variante 5 $\alpha 7V274T$ humano puede ser propenso a la abertura espontánea prolongada, debido a que los oocitos que han expresado $\alpha 7V274T$ durante 3 días o más, fueron 10-100 veces más filtrantes eléctricamente que los oocitos que expresan nAChR $\alpha 7$ de tipo natural humano. Así, $\alpha 7V274T$ humano y el nAChR variante relacionado pueden ser citotóxicos en la 10 presencia, y incluso en la ausencia de agonista. La expresión espontánea de tal variante podría interferir con la función de nAChR $\alpha 7$ normal, inducir la muerte celular prematura, o interferir con la formación de sinapsis. Tales efectos podrían sustentar algunas formas de enfermedades neurodegenerativas u otros desórdenes involucrando 15 desarreglo de la función colinérgica.

La citotoxicidad podría limitar claramente la capacidad de las células a expresar la variante $\alpha 7V274T$ a altos niveles. Para circunvenir esto, se hicieron crecer células transfectadas en la presencia de un antagonista nicotínico reversible o bloqueador de canal, tales como, metillicaconitina o 20 mecamilamina. Tales substancias prevendrían la citotoxicidad al bloquear el receptor o canal, pero podrían removese en breve antes de usar las células en experimentos adicionales.

De manera alternativa, $\alpha 7$ humana de tipo natural o variante se transfecta usando un sistema de expresión inducible, de manera que la 25 expresión de la subunidad $\alpha 7$ sea reprimida hasta que se adicione un

inductor. La ventaja de un sistema inducible es que puede eliminar los efectos citotóxicos de la proteína expresada, por ejemplo, la variante $\alpha 7V274T$ humana, que se observa cuando se emplea un sistema de expresión constitutivo, tal como el pRcCMV.

5 Uno de los vectores de expresión que se usa es el sistema LacSwitch (Stratagene) que usa los elementos del operón de lactosa para controlar la expresión de genes. Con el sistema LacSwitch, la expresión basal es muy baja en el estado reprimido y una vez transfecido establemente en líneas de células, este sistema permite la rápida
10 inducción dentro de 4-8 horas en presencia del agente de inducción, IPTG. El sistema emplea un vector eucariótico que expresa represor Lac (p3'SS) y un vector eucariótico conteniendo operador Lac (pOPRSVI-CAT) en el cual el constructo de subunidad $\alpha 7$ será insertado por clonación. La selección antibiótica se logra vía el gene de resistencia de higromicina en
15 p3'SS y vía el gene de resistencia de neomicina en el vector pOPRSVI-CAT. Después de la transfección de HEK-293 u otras células, la selección de líneas de células estables se logra por la presencia tanto de higromicina como geneticina. Una vez que se aíslan las líneas de células, se provocará la expresión de la subunidad $\alpha 7$ mediante la adición del
20 agente de inducción, IPTG. En la ausencia de IPTG, la transcripción se bloquea mediante la ligadura de la proteína de represor Lac al operador en el vector pOPRSVI-CAT. IPTG disminuye la afinidad por ligadura de la proteína de represor Lac al operador, disparando con ello la transcripción y expresión del gene de subunidad $\alpha 7$ insertado. La elección de tal

sistema permite la evaluación directa del papel del nAChR $\alpha 7$ mutante al mediar la muerte celular *in vitro*.

Valoración *in vitro* de citotoxicidad en líneas de células de mamífero:

Para determinar si la variante $\alpha 7V274T$ humana media la citotoxicidad, 5 puede valorarse el daño celular siguiendo la expresión transiente del cDNA en células HEK-293 por un número de métodos, por ejemplo: (i) manchar las células con azul Tripano (4%) durante 5 minutos y valorar la capacidad de células viables para excluir la tintura; (ii) medir los niveles de la enzima citosólica lactato deshidrogenas (LDH) liberada en el medio, como un 10 índice de la ruptura de las células (por ejemplo, Donnelly-Roberts *et al.* (1996) *Brain Res.* 719:36-44); (iii) toma de colorante rojo neutral o toma y conversión del MTT de tetrazolio como un índice de viabilidad (por ejemplo, Little *et al.* (1996) *Br. J. Dermatol.* 134: 199-207; D Souza *et al.* (1996) *J. Neurosci. Res.* 43:289-298; Malcolm *et al.* (1996) *J. Neurochem.* 15: 2350-2360); (iv) toma y ligadura de yoduro de propidio a ácidos nucleicos (por ejemplo, Wrobel *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 189:243-249) u otras técnicas que son sensibles a una pérdida de integridad de membrana de plasma o función metabólica celular. Pueden usarse 20 técnicas adicionales para valorar cambios en la incorporación de nucleótidos, estructura de DNA o integridad (por ejemplo, Alison y Sarraf (1995) *Hum. Exp. Toxicol.* 14: 234-247; Didier *et al.* (1996) *J. Neurosci.* 16:2238-2250). Estas técnicas son conocidas por aquéllos de habilidad ordinaria en la técnica. Estos estudios se realizaron en células no 25 transfecadas o de transfección simulada (controles), células que son transfecadas con $\alpha 7$ humana de tipo natural, y células que son

transfectadas con variante α 7V274T humana. La confirmación de que la expresión de variante α 7V274T humana conduce a citotoxicidad sugeriría un papel para disparar procesos neurodegenerativos *in vivo*.

Aplicación de diagnóstico: La presencia de la variante α 7V274T en 5 humanos podría ser determinada en una manera no invasiva, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y DNA genómico aislado de muestras sanguíneas siguiendo metodología estándar. De manera alternativa, si se aísla el RNA, entonces puede utilizarse PCR-de transcriptasa inversa ("RT-PCR") para detectar la variante α 7. La reacción 10 de PCR, por ejemplo, podría usar 100 ng del DNA en una reacción de PCR de 50 μ l estándar con los iniciadores sintéticos apropiados. Los iniciadores externos usados en la síntesis de la variante α 7 (X-5' y Y-3') permitirían a uno amplificar la región de interés. Los iniciadores serían elegidos para generar un fragmento de tamaño distinto abarcando el 15 segmento transmembrana de secuencia 2, en el cual tiene lugar la substitución V274T. Siguiendo la amplificación, se determina la secuencia de nucleótidos del mensaje. La presencia de la variante puede ser una indicación de enfermedad celular, tal como neurodegeneración u otras formas de citotoxicidad.

20 De esta manera, un método para detectar polinucleótidos objetivo de subunidad α 7 variante humana en una muestra de prueba comprende, (a) poner en contacto un polinucleótido objetivo de subunidad α 7 variante humana con al menos una sonda de polinucleótido específico de subunidad α 7 variante humana o complemento del mismo; y (b) detectar la presencia 25 del complejo de polinucleótido objetivo y sonda en la muestra de prueba.

Otro método para detectar el cDNA de mRNA de subunidad $\alpha 7$ humano en una muestra de prueba comprende, (a) realizar la transcripción inversa con el fin de producir cDNA; (b) amplificar el cDNA obtenido del paso (a); y (c) detectar la presencia de la subunidad $\alpha 7$ variante humana en la muestra 5 de prueba. De manera alternativa, el DNA muestrado o el cDNA preparado de RNA mediante RT-PCR puede ser amplificado usando iniciadores apropiados (por ejemplo, X-5' y Y-3') para permitir la detección de la variante mediante análisis de secuencia de nucleótidos. El paso de detección (c) comprende utilizar una porción detectable capaz de generar 10 una señal medible.

Un polinucleótido purificado o fragmento del mismo derivado de la subunidad $\alpha 7$ variante humana capaz de hibridar selectivamente al ácido nucleico de la subunidad $\alpha 7$ variante humana puede ser utilizado en estos métodos, en donde dicho polinucleótido tiene una secuencia que 15 comprende SEQ ID NO:1 o una porción del mismo. El polinucleótido purificado puede ser producido mediante técnicas recombinantes.

Un polipéptido codificado por subunidad $\alpha 7$ variante humana también es útil para aplicaciones de diagnóstico. El polipéptido, el cual tiene una secuencia de aminoácidos comprendiendo SEQ ID NO:2 o una porción de 20 la misma, puede ser producido mediante técnicas recombinantes o sintéticas.

Un anticuerpo monoclonal, el cual se liga específicamente a la subunidad $\alpha 7$ variante humana también puede ser utilizado en estos métodos. La subunidad $\alpha 7$ variante humana comprende la secuencia de 25 aminoácidos de SEQ ID NO:2 o una porción de la misma.

Un método para detectar la subunidad $\alpha 7$ variante humana en una muestra de prueba puede comprender, (a) poner en contacto dicha muestra de prueba con un anticuerpo o fragmento del mismo, el cual se liga específicamente a la subunidad $\alpha 7$ variante humana durante un tiempo y 5 bajo condiciones suficientes para la formación de complejos resultantes; y (b) detectar dichos complejos resultantes conteniendo dicho anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se liga específicamente a la subunidad $\alpha 7$ variante humana de SEQ ID NO:2 o un fragmento del mismo.

Aplicación de tratamiento: La mutación espontánea de valina-274 de 10 $\alpha 7$ humana a treonina y mutación relacionada podría resultar en, o apresurar, la muerte de aquéllas células expresando la proteína. Al menos dos tipos de tratamiento podrían intentarse: (i) la administración de un antagonista $\alpha 7$ selectivo, tal como, metillicaconitina u otro compuesto con penetración de barrera de cerebro-sangre mejorada; o, (ii) terapia de 15 oligonucleótido antisentido para bloquear la síntesis de la proteína (por ejemplo, ver Albert y Morris (1994), *Antisense knockouts: molecular scalpels for the dissection of signal transduction. Trends in Pharmacological Sciences* 15:250-254); o (iii) como un reactivo para matar células, tales como células cancerosas. Por ejemplo, puede usarse el 20 oligonucleótido antisentido 5'-GGCTACACCTCATGGGCTCG (SEQ ID NO:9). De esta manera, este u otros oligonucleótidos bloquearían la síntesis de cualquier proteína de subunidad $\alpha 7$, incluyendo el tipo natural, pero todavía sería de uso donde se expresa la variante y no el tipo natural, o donde el knockout del tipo natural es menos perjudicial que la expresión 25 continuada de la variante. La eficacia de este antisentido sería

demostrada *in vitro* y, además, el antisentido sería valioso como una herramienta de investigación eo evaluat la función de subunidad $\alpha 7$.

La tecnología antisentido puede usarse para reducir la expresión de gene a través de RNA o DNA antisentido o formación de la triple hélice, 5 ambos métodos basados en la ligadura de un polinucleótido para DNA o RNA. Por ejemplo, la porción de codificación 5' de la secuencia de polinucleótidos, la cual codifica el polipéptido de la presente invención, se usa para diseñar un oligonucleótido de RNA antisentido desde 10 hasta 40 pares de bases en longitud. Un oligonucleótido de DNA se diseña para ser 10 complementario a una región del gene involucrado en la transcripción, previniendo con ello la transcripción y la producción del polipéptido de subunidad $\alpha 7$ variante humana. El oligonucleótido de RNA antisentido hibrida al mRNA *in vivo* y bloquea la traducción de una molécula de mRNA en el polipéptido de subunidad $\alpha 7$ variante humana. Los oligonucleótidos 15 antisentido actúan con mayor eficacia cuando se modifican para contener enlaces de internucleótidos artificiales, los cuales hacen a la molécula resistente a corte nucleolítico. Tales enlaces internucleótidos artificiales incluyen, pero no están limitados a, enlaces internucleótidos de metilfosfato, fosforotiolato y fosforoamidato.

20 Investigación y aplicación del descubrimiento del medicamento: Los oligonucleótidos antisentido también serían de valor para determinar las funciones de $\alpha 7$ V274T y de tipo natural, y mecanismos de citotoxicidad en general. Por ejemplo, un método para evaluar la contribución de $\alpha 7$ V274T a la citotoxicidad, citoprotección u otros procesos celulares, sería 25 determinar si el bloqueo específico de su síntesis bloquea el proceso.

Esto difiere en aproximación del uso de un antagonista de receptor, el cual puede o no bloquear todos los efectos de la proteína. Adicionalmente, en el descubrimiento de medicamento, esta aproximación podría ser útil para evaluar si el efecto del medicamento es mediado por la variante $\alpha 7V274T$.

5 Una aproximación similar podría usarse para evaluar la contribución de otras variantes o la subunidad de tipo natural por sí misma. En experimentos de control, se usan los oligonucléotidos de sentido $\alpha 7$ y oligonucleótidos sin sentido correspondientes 5'-
CGAGCCCATGAGGTGTAGCC (SEQ ID NO:10) y 5'-
10 CCAGGCATTCGGAGCTTGCC (SEQ ID NO:11), respectivamente. El oligonucleótido sin sentido es una secuencia aleatoria que mantiene la proporción del contenido GC en el oligonucleótido antisentido, y no iguala las secuencias conocidas en la base de datos GenBank.

De esta manera, los polinucleótidos que codifican la novedosa 15 subunidad y sus variantes antisentido del nAChR $\alpha 7$ humano pueden usarse en una variedad de manera como se detalla en la presente. Aunque las modalidades preferidas de la presente invención han sido descritas con algún detalle, se entiende que pueden hacerse variaciones obvias sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención, como se 20 define por las reivindicaciones anexas.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Abbott Laboratories

5 (ii) TITULO DE LA INVENCION: Una subunidad de receptor de alfa-7 acetilcolina humana variante y metodos de produccion y uso de la misma

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 11

10 (iv) DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINARIO: Abbott Laboratories
(B) CALLE: 100 Abbott Park Road
(C) CIUDAD: Abbott Park
(D) ESTADO: IL
(E) PAIS: EU
15 (F) CODIGO POSTAL: 60064-3500

(v) FORMA LEGIBLE DE COMPUTADORA:
(A) TIPO DE MEDIO: DISCO de 8.89 cm
(B) COMPUTADORA: PC-compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS/Windows 95
20 (D) PAQUETERIA: Microsoft word 1997 (salvado como texto ASCII)

(vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:
(A) NUMERO DE SOLICITUD: PCT/US97/23405
(B) FECHA DE PRESENTACION: 22 de diciembre de 1997
(C) CLASIFICACION:

25 (viii) INFORMACION DEL ABOGADO/AGENTE:
(A) NOMBRE: Danckers, Andreas M.
(B) NUMERO DE REGISTRO: 32,652
(C) NUMERO DE REFERENCIA/CASO: 6017.PC.01

(ix) INFORMACION DE TELECOMUNICACIONES:
30 (A) TELEFONO: 847-937-6369
(B) TELEFAX: 847-938-2623

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 1:

35 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 1591 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) FILAMENTO: simple
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: DNA genómico

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1

CTCGAGCCC ATG AGG TGT AGC CCC GGA GGA GTG TGG CTG GCA CTG GCA	48
GCA TCT CTC CTG CAC GTG TCC CTG CAA GGC GAG TTC CAG AGG AAG CTT	96
TAC AAG GAG CTG GTC AAG AAC TAC AAT CCC TTG GAG AGG CCC GTG GCC	144
AAT GAC TCG CAA CCA CTC ACC GTC TAC TTC TCC CTG AGC CTC CTG CAG	192
ATC ATG GAC GTG GAT GAG AAG AAC CAA GTT TTA ACC ACC AAC ATT TGG	240
CTG CAA ATG TCT TGG ACA GAT CAC TAT TTA CAG TGG AAT GTG TCA GAA	288
TAT CCA GGG GTG AAG ACT GTT CGT TTC CCA GAT GGC CAG ATT TGG AAA	336
CCA GAC ATT CTT CTC TAT AAC AGT GCT GAT GAG CGC TTT GAC GCC ACA	384
TTC CAC ACT AAC GTG TTG GTG AAT TCT TCT GGG CAT TGC CAG TAC CTG	432
CCT CCA GGC ATA TTC AAG AGT TCC TGC TAC ATC GAT GTA CGC TGG TTT	480
CCC TTT GAT GTG CAG CAC TGC AAA CTG AAG TTT GGG TCC TGG TCT TAC	528
GGA GGC TGG TCC TTG GAT CTG CAG ATG CAG GAG GCA GAT ATC AGT GGC	576
TAT ATC CCC AAT GGA GAA TGG GAC CTA GTG GGA ATC CCC GGC AAG AGG	624
AGT GAA AGG TTC TAT GAG TGC TGC AAA GAG CCC TAC CCC GAT GTC ACC	672
TTC ACA GTG ACC ATG CGC CGC AGG ACA CTC TAC TAT GGC CTC AAC CTG	720
CTG ATC CCC TGT GTG CTC ATC TCC GCC CTC GCC CTG CTG GTG TTC CTG	768
CTT CCT GCA GAT TCC GGG GAG AAG ATT TCC CTG GGG ATA ACA GTC TTA	816
CTC TCT CTT ACC ACC TTC ATG CTG CTC GTG GCT GAG ATC ATG CCC GCA	864
ACA TCC GAT TCG GTA CCA TTG ATA GCC CAG TAC TTC GCC AGC ACC ATG	912
ATC ATC GTG GGC CTC TCG GTG GTG ACG GTG ATC GTG CTG CAG TAC	960
CAC CAC CAC GAC CCC GAC GGC GGC AAG ATG CCC AAG TGG ACC AGA GTC	1008
ATC CTT CTG AAC TGG TGC GCG TGG TTC CTG CGA ATG AAG AGG CCC GGG	1056
GAG GAC AAG GTG CGC CCG GCC TGC CAG CAC AAG CAG CGG CGC TGC AGC	1104
CTG GCC AGT GTG GAG ATG AGC GCC GTG GCG CCG CCG CCC GCC AGC AAC	1152
GGG AAC CTG CTG TAC ATC GGC TTC CGC GGC CTG GAC GGC GTG CAC TGT	1200
GTC CCG ACC CCC GAC TCT GGG GTA GTG TGT GGC CGC ATG GCC TGC TCC	1248
CCC ACG CAC GAT GAG CAC CTC CTG CAC GGC GGG CAA CCC CCC GAG GGG	1296
GAC CCG GAC TTG GCC AAG ATC CTG GAG GAG GTC CGC TAC ATT GCC AAC	1344
CGC TTC CGC TGC CAG GAC GAA AGC GAG GCG GTC TGC AGC GAG TGG AAG	1392
TTC GCC GCC TGT GTG GTG GAC CGC CTG TGC CTC ATG GCC TTC TCG GTC	1440
TTC ACC ATC ATC TGC ACC ATC GGC ATC CTG ATG TCG GCT CCC AAC TTC	1488
GTG GAG GCC GTG TCC AAA GAC TTT GCG TAACCACGCC TGGTTCTGTA	1535
CATGTGGAAA ACTCACAGAT GGGCAAGCGC TTTGGCTTGG CGAGATTGG CGGGAA	1591

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 2:

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 502 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 3:

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 25 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3

Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu 16
 10 Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe 25

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 4:

15 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 118 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) FILAMENTO: simple
 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4

GGGGGCAGCA CTCGAGCCCA TGAGGTGTAG CCCCAGGAGGA GTGTGGCTGG CACTGGCAGC 60
 20 ATCTCTCCTG CACGTGTCCC TGCAAGGCGAGTCCAGAGGAAGCTTACAAGGAGGGG 118

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 5:

25 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) FILAMENTO: simple
 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:5

GTTTGGGTCC TGGTCTTACG 20
 30

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 6:

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) FILAMENTO: simple
(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:6

GCAGCATGAA GGTGGTAAGA GAG

23

10 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) FILAMENTO: simple
(D) TOPOLOGIA: lineal

15 (xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:7

CTCTCTTACC ACCTTCATGC TGC

23

20 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) FILAMENTO: simple
(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:8

25 GTACTGCAGC ACGATCACCG

20

30 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) FILAMENTO: simple
(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:9

	GGCTACACCT CATGGGCTCG	20
	(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 10:	
5	(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) FILAMENTO: simple (D) TOPOLOGIA: lineal	
	(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:10	
10	CGAGCCCCATG AGGTGTAGCC	20
	(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 11:	
15	(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) FILAMENTO: simple (D) TOPOLOGIA: lineal	
	(xi) DESCRIPCION DE SECUENCIA: SEQ ID NO:11	
	CCAGGGCATTG GGAGCTTGCC	20
20		

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica una variante de una subunidad de receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) $\alpha 7$ humano de tipo natural, en donde el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene una substitución de aminoácido en la posición valina-274 del polipéptido de subunidad de nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural, y variantes degenerativas del mismo.
- 5 2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde la substitución es una treonina por valina-274.
- 10 3. Una célula huésped comprendiendo el polinucleótido de la reivindicación 1.
4. La célula huésped de la reivindicación 3, en donde dicha célula se selecciona del grupo que consiste de una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de anfibio y una célula de 15 estrella de mar.
5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 enlazado operablemente a secuencias de control que dirigen la transcripción del polinucleótido, por lo cual dicho polinucleótido se expresa en una célula huésped.
- 20 6. El vector de expresión de la reivindicación 5, en donde el nAChR $\alpha 7$ humano variante es nAChR $\alpha 5V274T$ humano.
7. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de las reivindicaciones 5 o 6.

8. La célula huésped de la reivindicación 7, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste de una celula bacteriana, una célula de mamífero, una célula de levadura y una célula de anfibio.
9. Una subunidad de receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) $\alpha 7$ humano variante, en donde la subunidad de nAChR $\alpha 7$ humano variante comprende una substitución de aminoácido en la posición valina-274 del polipéptido de nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural.
10. El receptor $\alpha 7$ humano variante de la reivindicación 9, en donde la substitución en una treonina por la valina-274.
- 10 11. Un método para identificar compuestos que modulan la actividad de receptor de acetilcolin anicotínico (nAChR), comprendiendo:
 - (a) proporciona una célula que expresa un polipéptido de nAChR $\alpha 7$ humano variante, que tiene una substitución de aminoácidos en la posición valina-274 del polipéptido de nAChR $\alpha 7$ de tipo natural;
 - 15 (b) mezclar un compuesto de prueba con la célula; y
 - (c) medir ya sea
 - (i) el efecto del compuesto de prueba en el receptor $\alpha 7$ variante o la célula que expresa dicha subunidad, o
 - (ii) la ligadura del compuesto de prueba a la célula o al
- 20 12. Un método para identificar un compuesto citoprotector, comprendiendo:
 - (a) proporcionar una célula que expresa un polipéptido de subunidad $\alpha 7$ humana variante o fragmento del mismo, que tiene una substitución de

aminoácido en la posición valina-274 del polipéptido de subunidad $\alpha 7$ humana de tipo natural;

(b) combinar un compuesto de prueba con la célula; y

(c) monitorear la célula o función celular para una indicación de 5 citotoxicidad.

13. Un método para detectar polinucleótidos objetivo de subunidad $\alpha 7$ variante humana en una muestra de prueba, comprendiendo:

(a) poner en contacto un polinucleótido objetivo de subunidad $\alpha 7$ variante humana con al menos una sonda de polinucleótido específico de 10 subunidad $\alpha 7$ variante humana o complemento de la misma; y

(b) detectar la presencia del complejo polinucleótido objetivo y sonda en la muestra de prueba.

14. Un polinucleótido purificado o fragmento del mismo derivado de la subunidad $\alpha 7$ variante humana capaz de hibridar selectivamente al ácido 15 nucleico de la subunidad $\alpha 7$ variante humana, en donde la secuencia de dicho polinucleótido comprende SEQ ID NO:1 o una porción del mismo, siendo producido dicho polinucleótido por técnicas recombinantes.

15. Un polipéptido codificado por un polinucleótido de subunidad $\alpha 7$ variante humana, en donde la secuencia de dicho polipéptido comprende 20 SEQ ID NO:2 o una porción de la misma, siendo producido dicho polipéptido por técnicas recombinantes o sintéticas.

16. Un anticuerpo monoclonal, el cual se liga específicamente a la subunidad $\alpha 7$ variante humana, que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2 o una porción de la misma.

17. RESUMEN

Se proporciona un polipéptido de receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ (nAChR) humano variante, en donde la variante contiene una 5 substitución de aminoácido en la posición 274 de valina del nAChR $\alpha 7$ humano de tipo natural. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican el nAChR $\alpha 7$ variante, vectores y células huésped 10 conteniendo tales moléculas de ácido nucleico. Además, se proporcionan métodos para producir la variante como son métodos para usar tales variantes para clasificar compuestos por actividad en el nAChR.

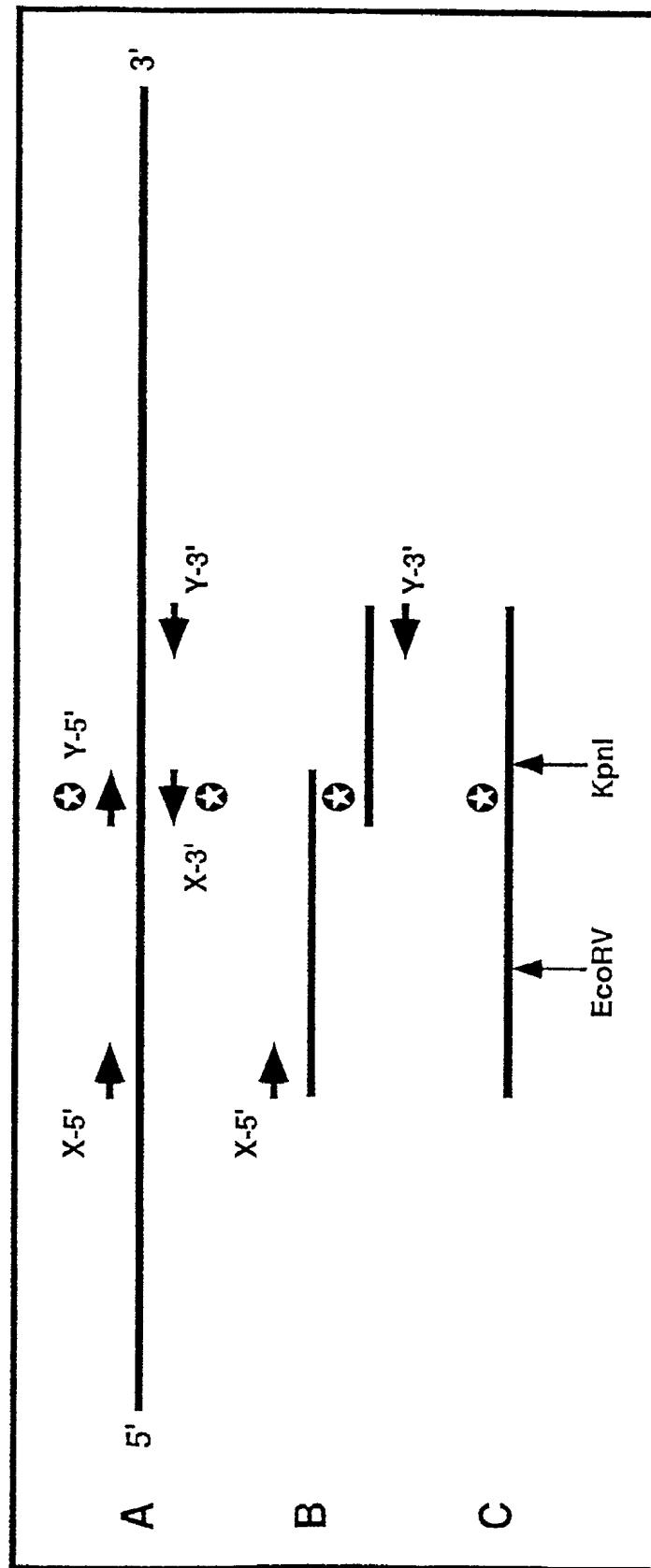


FIGURA 1

TCGAGCCC	ATG	AGG	TGT	AGC	CCC	GGG	GGG	GTG	TGG	CTG	GCA	CTG	GCA	39		
M	R	C	S	P	G	G	V	W	L	A	L	A	13			
GCA	TCT	CTG	CAC	GTG	TCC	CTG	CAA	GGC	GAG	TTC	CAG	AGG	AAG	CTT	87	
A	S	L	L	H	V	S	L	Q	G	E	F	Q	R	K	L	29
TAC	AAG	GAG	CTG	GTC	AAG	AAC	TAC	AAT	CCC	TTC	GAG	AGG	CCC	GTG	GCC	135
Y	K	E	L	V	K	N	Y	N	P	L	E	R	P	V	A	45
AAAT	GAC	TCG	CAA	CCA	CTC	ACC	GTC	TAC	TTC	TCC	CTG	AGC	CTC	CTG	CAG	183
N	D	S	Q	P	L	T	V	Y	F	S	L	S	L	L	Q	61
ATC	ATG	GAC	GTG	GAT	GAG	AAG	AAC	CAA	GTT	TAA	ACC	ACC	AAC	ATT	TGG	231
I	M	D	V	D	E	K	N	Q	V	L	T	T	N	I	W	77
CTG	CAA	ATG	TCT	TGG	ACA	GAT	CAC	TAT	TTA	CAG	TGG	AAT	GTG	TCA	GAA	279
L	Q	M	S	W	T	D	H	Y	L	Q	W	N	V	S	E	93
TAT	CCA	GGG	GTG	AAG	ACT	GTT	CGT	TTC	CCA	GAT	GGC	CAG	ATT	TGG	AAA	327
Y	P	G	V	K	T	V	R	F	P	D	G	Q	I	W	K	109
CCA	GAC	ATT	CTT	CTC	TAT	AAC	AGT	GCT	GAT	GAG	CGC	TTT	GAC	GCC	ACA	375
P	D	I	L	L	Y	N	S	A	D	E	R	F	D	A	T	125
TTC	CAC	ACT	AAC	GTG	TTG	GTG	AAT	TCT	TCT	GGG	CAT	TGC	CAG	TAC	CTG	423
F	H	T	N	V	L	V	N	S	S	G	H	C	Q	Y	L	141
CCT	CCA	GGC	ATA	TTC	AAG	AGT	TCC	TGC	TAC	ATC	GAT	GTA	CGC	TGG	TTT	471
P	P	G	I	F	K	S	S	C	Y	I	D	V	R	W	F	157
CCC	TTT	GAT	GTG	CAG	CAC	TGC	AAA	CTG	AAG	TTT	GGG	TCC	TGG	TCT	TAC	519
P	F	D	V	Q	H	C	K	L	K	F	G	S	W	S	Y	173
GGG	GGC	TGG	TCC	TTG	GAT	CTG	CAG	ATG	CAG	GAG	GCA	<u>GAT</u>	<u>ATC</u>	AGT	GGC	567
G	G	W	S	L	D	L	Q	M	Q	E	A	D	I	S	G	189

TAT	ATC	CCC	AAAT	GGA	GAAT	TGG	GAC	CTA	GTG	GGAA	ATC	CCC	GGC	AAG	AGG	615		
Y	I	P	N	G	E	W	D	L	V	G	I	P	G	K	R	205		
AGT	GAA	AGG	TTC	TAT	GAG	TGC	TGC	AAA	GAG	CCC	TAC	CCC	GAT	GTC	ACC	663		
S	E	R	F	Y	E	C	C	K	E	P	Y	P	D	V	T	221		
TTC	ACA	GTG	ACC	ATG	CGC	CGC	AGG	ACA	CTC	TAC	TAT	GGC	CTC	AAC	CTG	711		
F	T	V	T	M	R	R	R	T	L	Y	Y	G	L	N	L	237		
CTG	ATC	CCC	TGT	GTG	CTC	ATC	TCC	GCC	CTC	GCC	CTG	CTG	GTG	TTC	CTG	759		
L	I	P	C	V	L	I	S	A	L	A	L	L	V	F	L	253		
CCT	CCT	GCA	GAT	TCC	GGG	GGG	GAG	AAG	ATT	TCC	CTG	GGG	ATA	ACA	GTC	TTA	807	
L	P	A	D	S	G	E	K	I	S	L	G	I	T	V	L	269		
CTC	TCT	CTT	ACC	ACC	TTC	ATG	CTG	CTG	CTC	GCT	GTG	GCT	GAG	ATC	ATG	CCC	GCA	855
L	S	L	T	T	F	M	L	L	V	A	E	I	M	P	A	285		
ACA	TCC	GAT	TCG	<u>GTA</u>	<u>CCA</u>	TTC	ATA	GCC	CAG	TAC	TTC	GCC	AGC	ACC	ATG	903		
T	S	D	S	V	P	L	I	A	Q	Y	F	A	S	T	M	301		
ATC	ATC	GTG	GGC	CTC	TCG	GTG	GTG	ACG	GTG	ATC	GTG	CTG	CAG	TAC	951			
I	I	V	G	L	S	V	V	V	T	V	I	V	L	Q	Y	317		
CAC	CAC	GAC	CCC	GAC	GGC	GGC	AAG	ATG	CCC	AAG	TGG	ACC	AGA	GTC	999			
H	H	D	P	D	G	G	K	M	P	K	W	T	R	V	333			
ATC	CTT	CTG	AAC	TGG	TGC	GCG	TGG	TTC	CTG	CGA	ATG	AAG	AGG	CCC	GGG	1047		
I	L	L	N	W	C	A	W	F	L	R	M	K	R	P	G	349		
GAG	GAC	AAG	GTG	CGC	CCG	GCC	TGC	CAG	CAG	CGG	CGC	TGC	AGC	1095				
E	D	K	V	R	P	A	C	Q	H	K	Q	R	C	S	350			
CTG	GCC	AGT	GTG	GAG	ATG	AGC	GCC	GTG	GCG	CCG	CCC	GCC	AGC	AAC	1143			
L	A	S	V	E	M	S	A	V	A	P	P	A	S	N	366			

GGG	AAC	CTG	CTG	TAC	ATC	GGC	TTC	GGC	CTG	GAC	GGC	GTG	CAC	TGT	1191	
G	N	L	L	Y	I	G	F	R	G	L	D	G	V	H	C	382
GTC	CCG	ACC	CCC	GAC	TCT	GGG	GTA	GTG	TGT	GGC	CGC	ATG	GCC	TGC	TCC	1239
V	P	T	P	D	S	G	V	V	C	G	R	M	A	C	S	398
CCC	ACG	CAC	GAT	GAG	CAC	CTC	CTG	CAC	GGC	GGG	CAA	CCC	CCC	GAG	GGG	1287
P	T	H	D	E	H	L	L	H	G	G	Q	P	P	E	G	414
GAC	CCG	GAC	TTG	GCC	AAG	ATC	CTG	GAG	GAG	GTC	CGC	TAC	ATT	GCC	AAC	1335
D	P	D	L	A	K	I	L	E	E	V	R	Y	I	A	N	430
CGC	TTC	CGC	TGC	CAG	GAC	GAA	AGC	GAG	GGC	GTC	TGC	AGC	GAG	TGG	AAG	1383
R	F	R	C	Q	D	E	S	E	A	V	C	S	E	W	K	446
TTC	GCC	GCC	TGT	GTG	GTG	GAC	CGC	CTG	TGC	CTC	ATG	GCC	TTC	TCG	GTC	1431
F	A	A	C	V	V	D	R	C	L	C	L	M	A	F	S	462
TTC	ACC	ATC	TGC	ACC	ATC	GGC	ATC	CTG	ATG	TGC	GCT	CCC	TTC	TCG	GTC	1479
F	T	I	C	T	I	G	I	L	M	S	A	P	N	F	478	
GTG	GAG	GCC	GTG	TCC	AAA	GAC	TTT	GGG	TAACCACGCCCTGGTTCTGTACATGTGG							
V	E	A	V	S	K	D	F	A								

AAACTCACAGATGGCAAGCGCTTGGCTGGAGATTGGCCGGAA

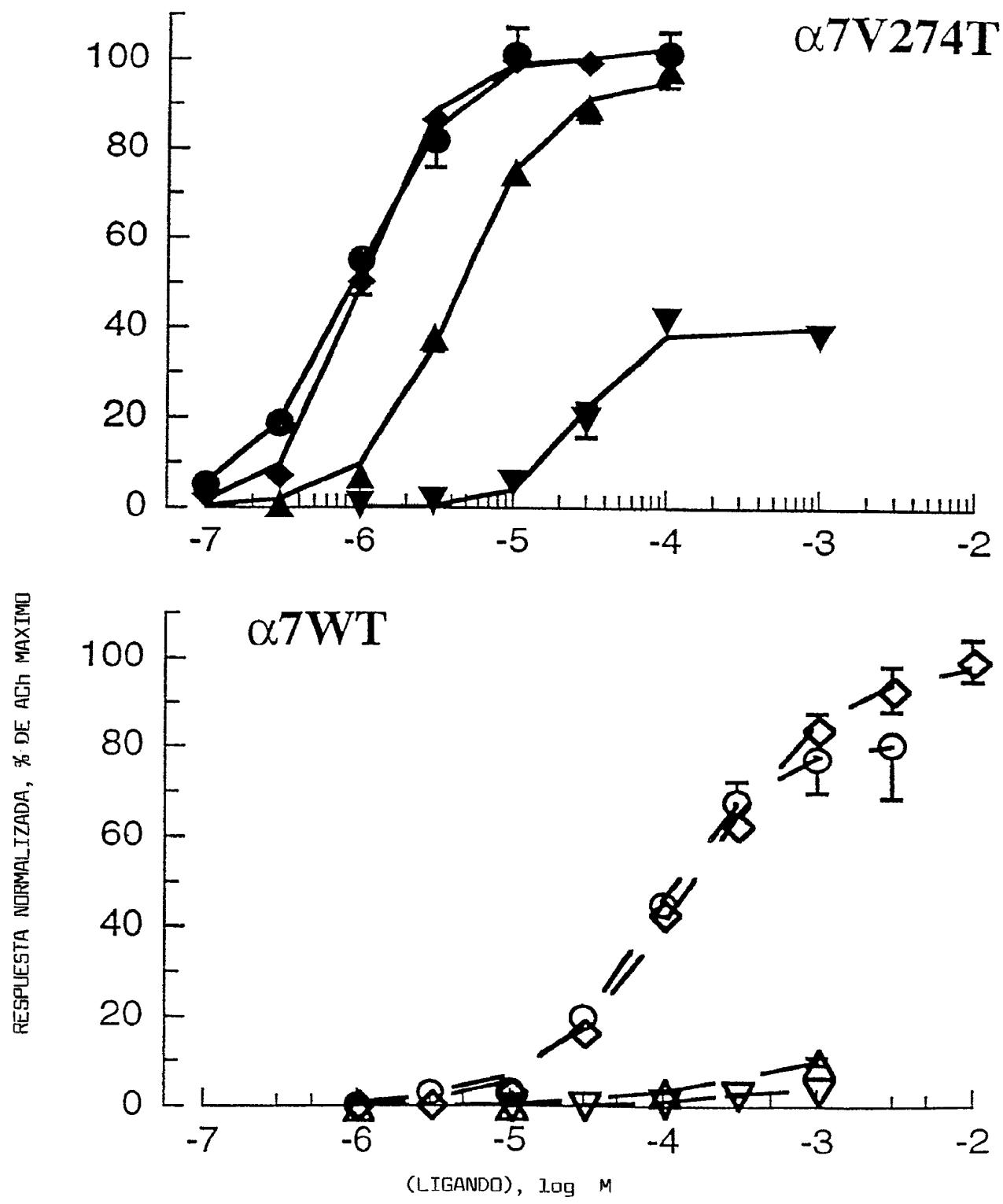


FIGURA 3

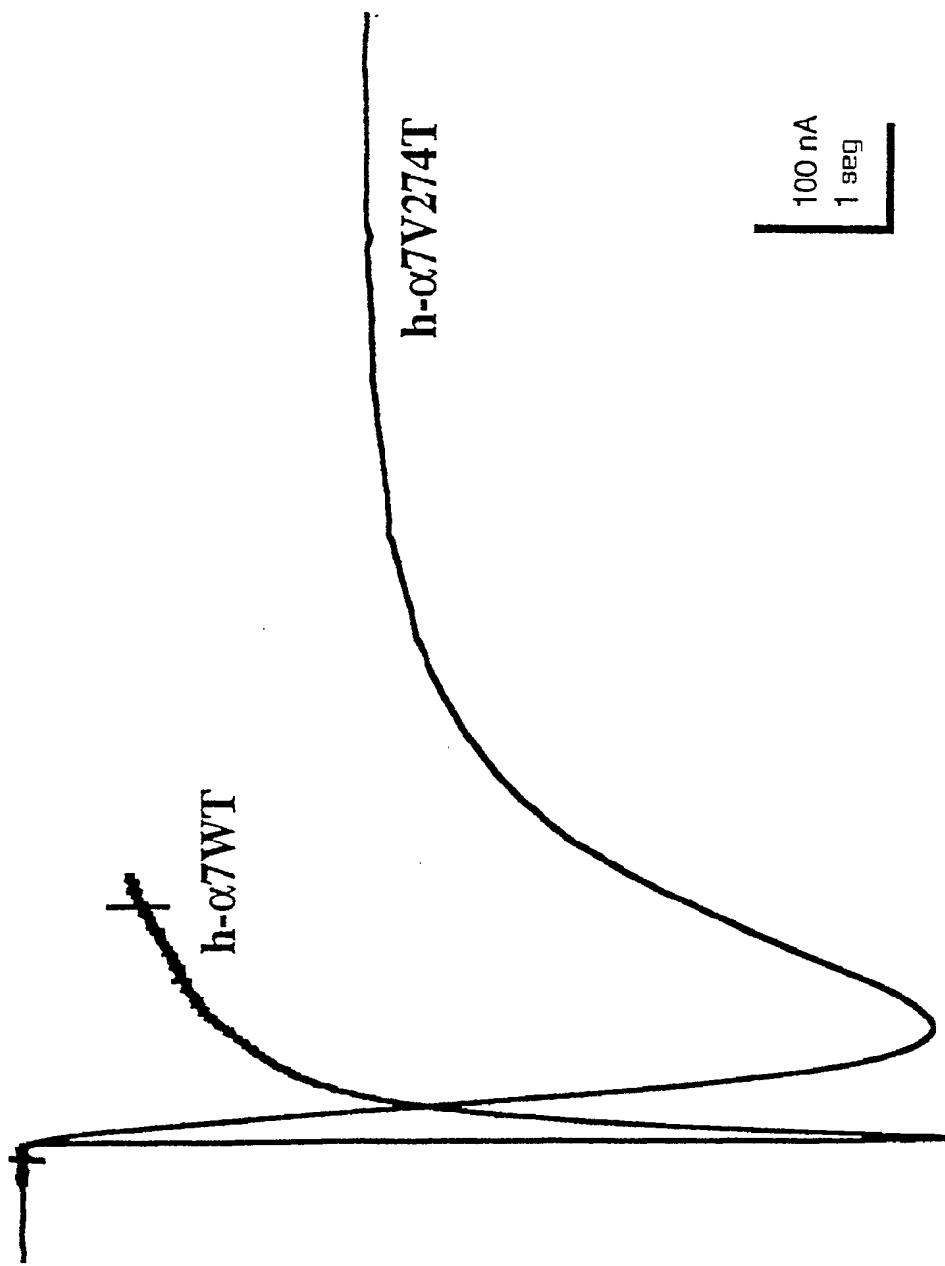


FIGURA 4

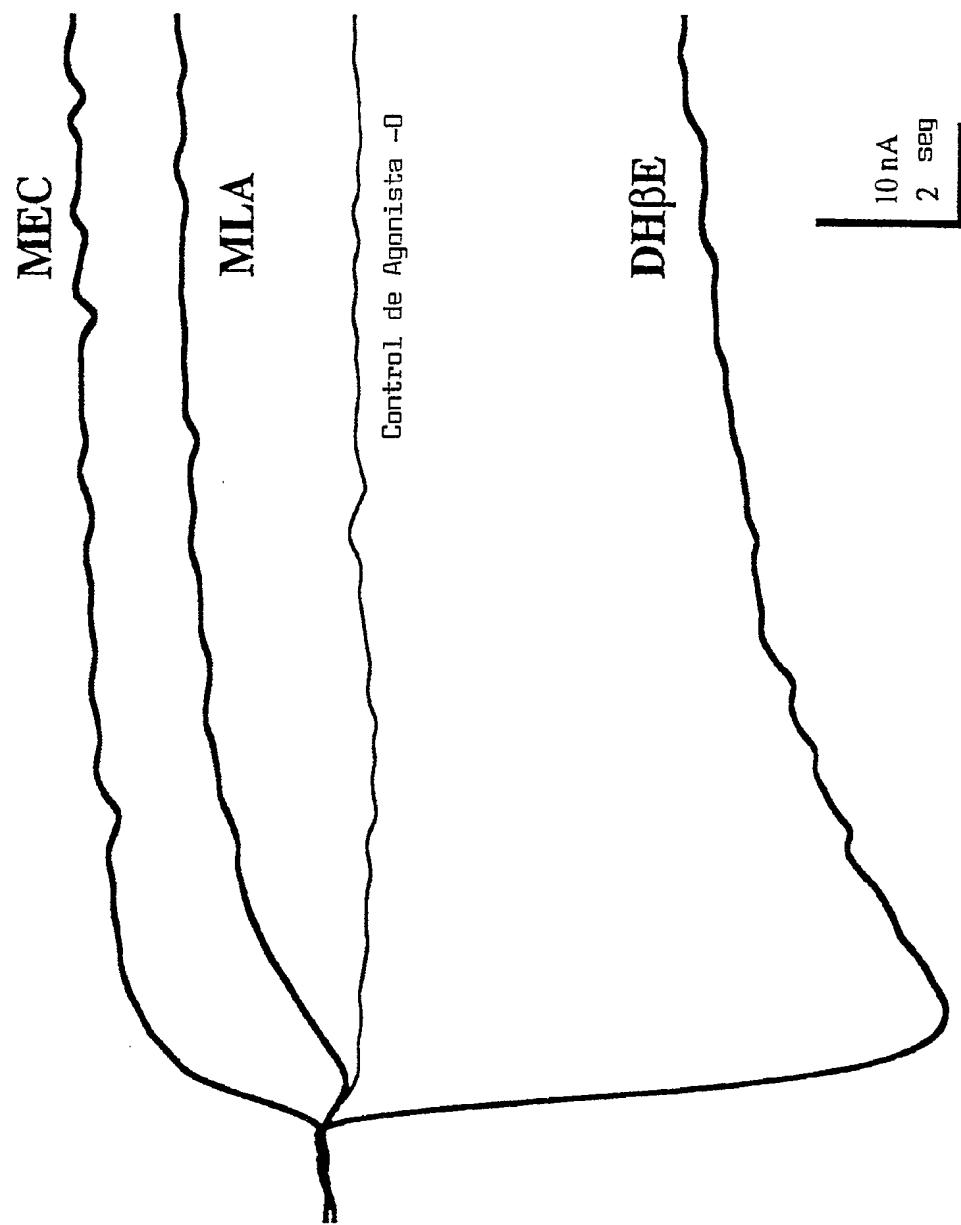


FIGURA 5

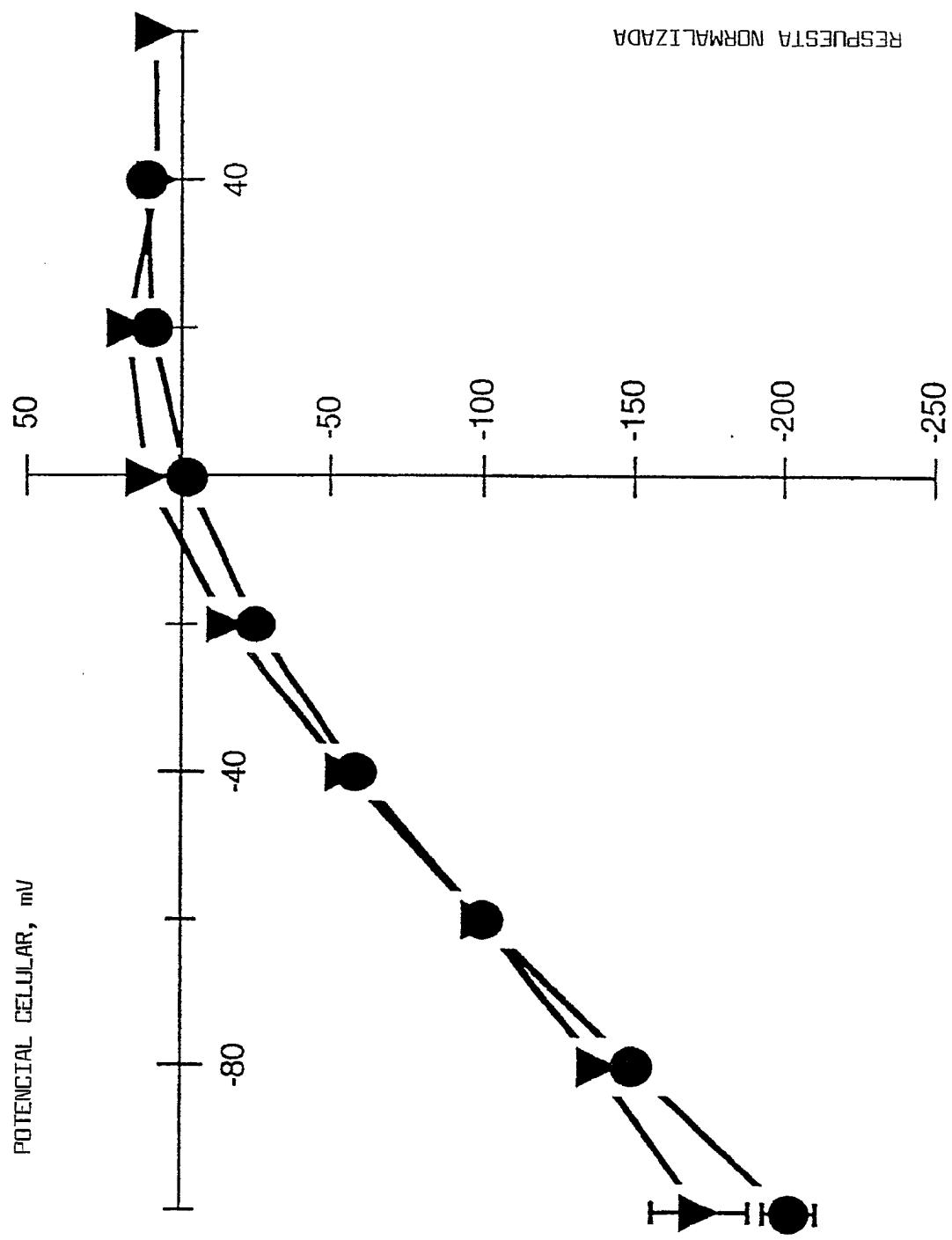


FIGURA 6

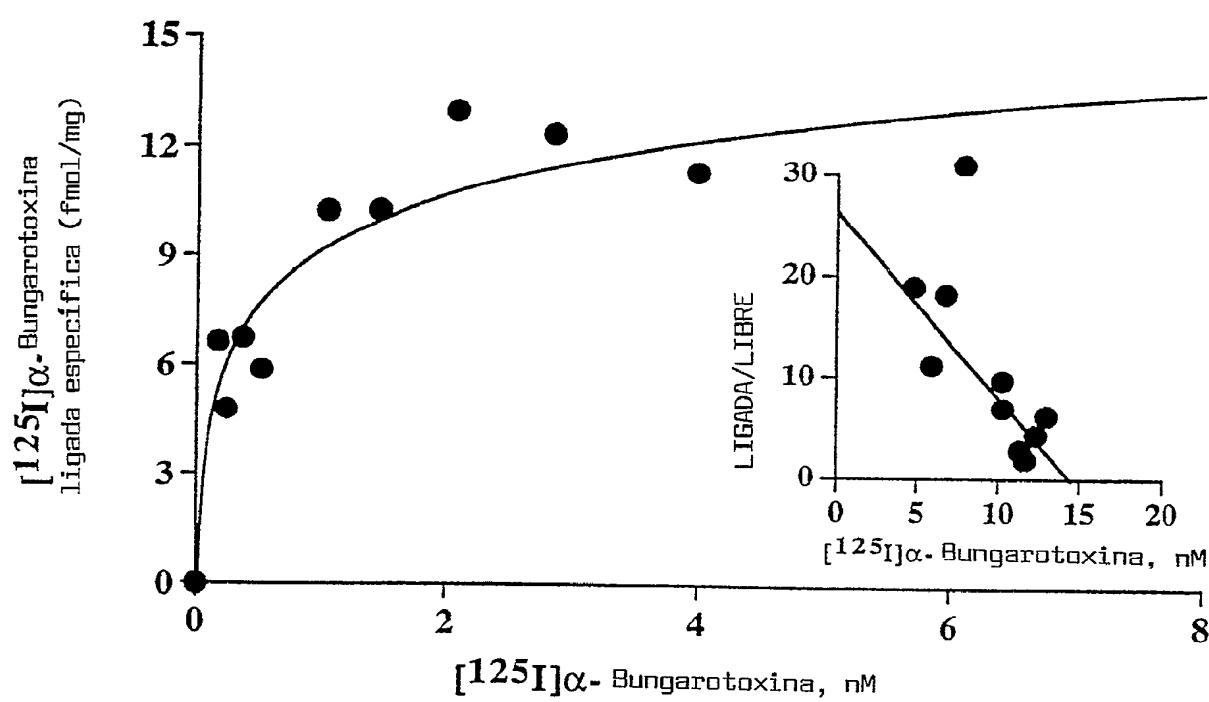


FIGURA 7